

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Mecanismos moleculares de resistencia e  
hipersensibilidad a fármacos antirretrovirales  
mediados por deleciones en la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  de  
la retrotranscriptasa del virus de la  
inmunodeficiencia humana tipo 1**

TESIS DOCTORAL

Mónica Kisic Aguirre,

Madrid, 2010



Memoria presentada por la Lda. en Biología Mónica Kisic Aguirre para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Octubre, 2010.



El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (C.S.I.C.-U.A.M), bajo la dirección del Dr. Luis Menéndez Arias, con financiación por parte de la Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE) (beca asociada al proyecto 36523/05).



**A mis padres**





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Luis Menéndez-Arias por haberme concedido la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en un laboratorio de tan alto nivel científico y por las horas de dedicación durante estos años.

Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, conocerlos y tenerlos diariamente durante estos años ha sido un placer. A todos, gracias por su apoyo especialmente en estos últimos meses. Gracias Gilberto por ese humor que te caracteriza y que nos hace reír; Mar, gracias por todas las risas!; Vero, gracias por tu sonrisa y alegría ☺ y Tania, especialmente, quiero que sepas que acá tienes una amiga y por todo lo demás (que es más que mucho) GRACIAS, a veces las palabras sobran y sin duda este es uno de los casos guapi.

Gracias a los Doctores Miguel Angel Martínez, Javier Martínez-Picado y Jesús Mendieta por su importante colaboración en este trabajo. Gracias al Lab.121 (antiguo 303), los que siguen [Celia, Vero y Ana (siempre pendiente de todos los detalles)] y los que ya no están: Mónica, Armando, Marta y Samuel. Gracias a Ana Quintas, a Cristina, Pepa!, Mercedes, y a todas aquellas personas que han aportado sonrisas a todos estos años en el CBM. Gracias a la gente de instrumentación y material por hacer nuestro trabajo más fácil.

Gracias a mis 7 preferidas que encontré en el CBM, cada una de ustedes es una amiga para mí. Elena, gracias por todas las conversaciones y sobretodo por tu confianza; Pekeña! Gracias por aparecer de ultimitas en el CBM! Ya sabes: tenemos una cita aus Berlin! Gracias a Prado (y su parra), a Maca (majaaa eres increíble), Carolina! Gracias por todos tus detalles; Chanchiii, eres lo mássss, te extrañamos! Y sobretodo GRACIAS Glori por tu bondad y por el apoyo increíble que has sido, decirte que contigo también me sobran las palabras. Gracias a mi preferido: Rubén!! Eres el mejor! Gracias por todos los chocolates y gracias por ser como eres (pajísima!), sólo con eso me das alegría. Por supuesto gracias a Sam, ha sido un placer haberte conocido y espero que no pase mucho más tiempo sin vernos!

Gracias a todos mis amigos de Perú, de España y resto del mundo. Gracias por darme tanto y por todos los buenos momentos. A mis amigas de la UPCH por esos años maravillosos! Gracias especiales a Samu, Ana (Carita de Fresa!), Mario, mi Camaguey, Franco, Esteban (eres demasiado), Luchi y Male (aunque las vea poco, somos familia!), Cris (siempre pendiente) y Diana (mi italiana favorita!).

Gracias a Ton, mi churro, gracias por ser como eres, por tu compañía, por tu paciencia y gracias por todo todo lo demás. T.A.L.

Gracias a TODA mi familia maravillosa, son lo más importante para mí. A mis abuelitos que ya no están, esta Tesis es para ustedes también. Cristi! No sé que haría sin ti! Drago, Nicolás (Petis): los mejores dos hermanos que una puede pedir, los adoro.

A mis papás. Gracias Ma por darme esa parte tan linda de ti y por enseñarme los detalles tan lindos de la vida. Gracias Pa por ser mi mejor consejero y sin duda el mejor papá del mundo. Sin Ustedes esto no habría sido posible y por eso les dedico esta Tesis.



*“Los imposibles de hoy serán  
posibles mañana.”*

Konstantin Tsiolkovsky



## ABREVIATURAS

|                  |   |
|------------------|---|
| 3TC              | 2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina, lamivudina                 |
| 3TCMP            | 2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina-5'-monofosfato              |
| 3TCTP            | 2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina-5'-trifosfato               |
| ABC              | Abacavir  |
| APV              | Amprenavir  |
| ATP              | Adenosina-5'-trifosfato                                   |
| ATV              | Atazanavir  |
| AZT              | 3'-azido-3'-desoxitimidina, zidovudina                    |
| AZTMP            | 3'-azido-3'-desoxitimidina-5'-monofosfato                 |
| AZTTP            | 3'-azido-3'-desoxitimidina-5'-trifosfato                  |
| AZTp4A           | 3'-azido-3'-desoxitimidina-(5')-tetrafosfo-(5')-adenosina |
| BLV              | Virus de la leucemia bovina                               |
| BSA              | Seroalbúmina bovina                                       |
| CA               | Proteína de la cápsida (p24, en el VIH-1)                 |
| CAEV             | Virus de la encefalitis artrítica de cabra                |
| CI <sub>50</sub> | Concentración inhibitoria al 50%                          |
| d4T              | 2',3'-dideshidro-2'3'-didesoxitimidina, estavudina        |
| d4TMP            | 2',3'-dideshidro-2'3'-didesoxitimidina-5'-monofosfato     |
| d4TTP            | 2',3'-dideshidro-2'3'-didesoxitimidina-5'-trifosfato      |
| dATP             | 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato                          |
| dCTP             | 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato                           |
| ddA              | 2',3'-didesoxiadenosina                                   |
| ddAMP            | 2',3'-didesoxiadenosina-5'-monofosfato                    |
| ddATP            | 2',3'-didesoxiadenosina-5'-trifosfato                     |
| ddC              | 2',3'-didesoxicitidina, zalcitabina                       |
| ddCMP            | 2',3'-didesoxicitidina-5'-monofosfato                     |
| ddl              | 2',3'-didesoxiinosina, didanosina                         |
| ddNTP            | 2',3'-didesoxirribonucleósido-5'-trifosfato               |
| ddTMP            | 2'-didesoxitimidina-5'-monofosfato                        |
| dGTP             | 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato                          |
| DLV              | Delavirdina   |
| DNA              | Ácido desoxirribonucleico                                 |
| dNTP             | 2'-desoxirribonucleósido-5'-trifosfato                    |
| DTT              | Ditiotreitol  |
| dTTP             | 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato                           |

|                  |   |
|------------------|---|
| EDTA             | Etilendiaminotetraacetato sódico                          |
| EFV              | Efavirenz   |
| EIAV             | Virus de la anemia infecciosa equina                      |
| FIV              | Virus de la inmunodeficiencia felina                      |
| FTC              | 2',3'-didesoxi-5-fluoro-3'-tiacitidina, emtricitabina     |
| HAART            | "Highly active antirretroviral therapy"                   |
| HTLV-1           | Virus de la leucemia humana de células T                  |
| IDV              | Indinavir   |
| IN               | Integrasa   |
| IPTG             | Isopropil-β-D-tio-galactopiranosido                       |
| LPV              | Lopinavir   |
| LTRs             | "Long terminal repeat", secuencia terminal repetida larga |
| MA               | Proteína de la matriz (p17, en el VIH-1)                  |
| Mg <sup>2+</sup> | Magnesio (catión)   |
| MMTV             | Virus del tumor mamario de ratón                          |
| Mo-MLV           | Virus Moloney de la leucemia de ratón                     |
| MPMV             | Virus Mason-Pfizer de monos                               |
| NC               | Proteína de la nucleocápsida (p7, en el VIH-1)            |
| NFV              | Nelfinavir  |
| NNRTI            | Inhibidor de la RT no análogo a nucleósido                |
| NRTI             | Inhibidor de la RT análogo a nucleósido                   |
| NVP              | Nevirapina  |
| pb               | Par de bases  |
| PCR              | Reacción en cadena de la polimerasa                       |
| PI               | Inhibidor de proteasa                                     |
| PMSF             | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo                           |
| PPi              | Pirofosfato   |
| PR               | Proteasa viral  |
| RNA              | Ácido ribonucleico  |
| RNA <sub>m</sub> | Ácido ribonucleico mensajero                              |
| RNasa H          | Ribonucleasa H  |
| RT               | Retrotranscriptasa  |
| RTV              | Ritonavir   |
| SIDA             | Síndrome de inmunodeficiencia adquirida                   |
| SIV              | Virus de la inmunodeficiencia de simios                   |
| SU               | Glicoproteína de superficie (gp120, en el VIH-1)          |
| T-20             | Enfuvirtide (péptido T-20)                                |

|       |  |
|-------|--|
| TAM   | Mutación de resistencia asociada a análogos a timidina |
| TFV   | Tenofovir  |
| TM    | Glicoproteína transmembranal (gp41, en el VIH-1)       |
| VIH-1 | Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1            |
| VIH-2 | Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2            |
| VISNA | Virus Visna  |
| WT    | Tipo silvestre ("wild-type")                           |
| ZDV   | Zidovudina   |

## **NOMENCLATURA DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS**

**A** (Ala) Alanina  
**C** (Cys) Cisteína  
**D** (Asp) Ácido aspártico  
**E** (Glu) Ácido glutámico  
**F** (Phe) Fenilalanina  
**G** (Gly) Glicina  
**H** (His) Histidina  
**I** (Ile) Isoleucina  
**K** (Lys) Lisina  
**L** (Leu) Leucina  
**M** (Met) Metionina  
**N** (Asn) Asparagina  
**P** (Pro) Prolina  
**Q** (Gln) Glutamina  
**R** (Arg) Arginina  
**S** (Ser) Serina  
**T** (Thr) Treonina  
**V** (Val) Valina  
**W** (Trp) Triptófano  
**Y** (Tyr) Tirosina





# ÍNDICE

|   | Página |
|---|--------|
| <b>RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY)</b>  | 1      |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>  | 5      |
| 1.1 El virus de la inmunodeficiencia humana   | 7      |
| 1.2 La RT del VIH-1   | 11     |
| 1.2.1 Características y función de la RT del VIH-1  | 11     |
| 1.2.2 Motivos conservados en DNA y RNA polimerasas  | 12     |
| 1.2.3 Estructura de la RT   | 13     |
| 1.3 Tratamiento antirretroviral   | 15     |
| 1.3.1 NRTIs   | 17     |
| 1.3.1.1 Resistencia a NRTIs   | 18     |
| A) Discriminación en la incorporación de NRTIs trifosforilados frente a dNTPs   | 19     |
| B) Escisión de NRTIs  | 22     |
| 1.3.2 NNRTIs  | 27     |
| 1.3.2.1 Resistencia a NNRTIs  | 28     |
| 1.3.3 Patrones mutacionales de multirresistencia en la RT del VIH-1: Inserciones y deleciones   | 30     |
| 1.3.4 Antecedentes específicos del trabajo: Estudio de un aislado clínico multirresistente del VIH-1 portador de una deleción en la posición 69 de la RT (Villena <i>et al.</i> , 2007) | 32     |
| <b>2. OBJETIVOS</b>   | 37     |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | 41     |
| 3.1 Amplificación y clonación de las RTs  | 43     |
| 3.2 Mutagénesis dirigida  | 45     |

|   |    |
|---|----|
| <b>3.3 Expresión y purificación de RTs</b>  | 48 |
| 3.3.1 Expresión de la RT  | 48 |
| 3.3.2 Lisis de las bacterias  | 48 |
| 3.3.3 Cromatografía de intercambio iónico   | 49 |
| 3.3.4 Cromatografía de afinidad   | 49 |
| 3.3.5 Comprobación de la pureza y concentración de la enzima obtenida   | 49 |
| <b>3.4 Nucleótidos, inhibidores y preparación de complejos molde-iniciador DNA/DNA</b>                                | 50 |
| 3.4.1 Preparación del iniciador bloqueado con AZT   | 51 |
| <b>3.5 Determinación de la concentración de enzima activa</b>   | 52 |
| <b>3.6 Ensayos cinéticos</b>  | 53 |
| 3.6.1 Ensayos cinéticos de incorporación de nucleótidos en el estado pre-estacionario                                 | 55 |
| 3.6.1.1 Incorporación de dNTPs correctos  | 55 |
| 3.6.1.2 Incorporación de NRTIs trifosforilados  | 56 |
| 3.6.2 Ensayos cinéticos de incorporación de nucleótido en el estado estacionario                                      | 57 |
| 3.6.3 Ensayos de estabilidad del heterodímero de la RT en presencia de urea   | 58 |
| 3.6.4 Determinación de la $CI_{50}$ de NNRTIs   | 59 |
| 3.6.5 Inhibición de las RTs por foscarnet y fosfonoacetato  | 60 |
| 3.6.6 Ensayos de afinidad por el DNA  | 61 |
| 3.6.7 Ensayos de afinidad por nevirapina  | 62 |
| <b>3.7 Ensayos de rescate de iniciadores bloqueados con NRTIs</b>   | 64 |
| 3.7.1 Ensayos de escisión de AZTMP en presencia de foscarnet, en condiciones de estado pre-estacionario               | 65 |
| <b>4. RESULTADOS</b>  | 67 |
| <b>4.1 Caracterización de RTs multirresistentes portadoras de la delección <math>\Delta 69</math></b>                 | 69 |
| 4.1.1 Análisis de la actividad DNA polimerasa mediante ensayos de incorporación de dNTP en el estado pre-estacionario | 70 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.1.2 Resistencia a AZT   | 72  |
| 4.1.2.1 Ensayos de incorporación de AZTTP   | 73  |
| 4.1.2.2 Escisión de AZT-monofosfato (AZTMP) de iniciadores de DNA bloqueados  | 75  |
| 4.1.3 Resistencia a NNRTIs  | 77  |
| 4.1.3.1 Determinación de la $CI_{50}$ para efavirenz de las enzimas multirresistentes   | 77  |
| 4.1.3.2 Contribución de K103N a la resistencia a NNRTIs   | 78  |
| 4.1.3.3 Estabilidad del heterodímero en RTs multirresistentes y efecto de K103N sobre la interacción de la enzima con el complejo molde-iniciador   | 80  |
| 4.1.3.4 Papel de A376S en la resistencia a nevirapina   | 82  |
| <b>4.2 Papel de la delección <math>\Delta 69</math> en el mecanismo molecular de resistencia a NRTIs</b>  | 84  |
| 4.2.1 Papel de la delección $\Delta 69$ en resistencia a 3TC  | 84  |
| 4.2.1.1 Discriminación entre dCTP y 3TCTP analizada mediante ensayos cinéticos de incorporación de nucleótidos en el estado pre-estacionario  | 84  |
| 4.2.1.2 Escisión de 3TC-monofosfato (3TCMP) de iniciadores de DNA bloqueados  | 87  |
| 4.2.2 Efecto de la delección $\Delta 69$ sobre la hipersensibilidad al AZT  | 88  |
| 4.2.2.1 Discriminación entre dTTP y AZTTP analizada mediante ensayos cinéticos de incorporación de nucleótido en el estado pre-estacionario   | 88  |
| 4.2.2.2 Escisión de AZTMP de iniciadores de DNA bloqueados  | 90  |
| 4.2.2.3 Inhibición de la reacción de escisión por el siguiente nucleótido complementario  | 92  |
| 4.2.3 Efecto de la delección $\Delta 69$ sobre la sensibilidad a foscarnet  | 93  |
| 4.2.3.1 Determinación de los valores de $CI_{50}$ para foscarnet en ensayos de incorporación de dTTP y AZTTP  | 93  |
| 4.2.3.2 Escisión de AZTMP en presencia de foscarnet en condiciones de estado pre-estacionario   | 95  |
| <b>4.3 Papel de las delecciones <math>\Delta 67</math> y <math>\Delta 69</math> en el mecanismo de escisión dependiente de ATP o <math>PPi</math> de RTs del VIH-1 portadoras de mutaciones de resistencia a análogos a timidina (TAMs)</b> | 97  |
| 4.3.1 Caracterización de la RT recombinante S68G/ $\Delta 69$ /K70G (G $\Delta 69$ G): Eficiencia de incorporación de dTTP y de escisión de AZTMP y d4T-monofosfato (d4TMP) de iniciadores de DNA bloqueados                                | 101 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.3.2 Escisión de AZTMP y d4TMP de iniciadores de DNA bloqueados catalizada por la RT $\Delta 67/T69G/K70R$ ( $\Delta 67GR$ )   | 103 |
| 4.3.3 Efecto de las TAMs M41L/T215Y en la escisión de análogos a timidina catalizada por las RTs $\Delta 67GR$ y $G\Delta 69G$  | 105 |
| 4.3.4 Papel de la mutación K219E en la escisión de AZTMP y d4TMP de iniciadores de DNA bloqueados, catalizada por RTs portadoras de las delecciones $\Delta 67$ y $\Delta 69$           | 106 |
| <b>5. DISCUSIÓN</b>   | 109 |
| 5.1 Resistencia a efavirenz de las variantes multirresistentes, selección de mutaciones de resistencia y aparición de la delección $\Delta 69$ durante el tratamiento antirretroviral   | 111 |
| 5.2 Efecto de mutaciones en el subdominio “connection” sobre la resistencia a NNRTIs: Análisis del papel de A376S en la resistencia a nevirapina  | 113 |
| 5.3 Determinantes moleculares de la resistencia al AZT en RTs multirresistentes portadoras de la delección $\Delta 69$  | 116 |
| 5.4 Resistencia a 3TC e hipersensibilidad al AZT conferida por la delección $\Delta 69$ en ausencia de mutaciones de resistencia a NRTIs y NNRTIs                                       | 117 |
| 5.5 Efectos potenciales de la delección $\Delta 69$ sobre la estructura de la RT del VIH-1: Implicaciones en resistencia  | 118 |
| 5.6 Influencia de las RTs S68G/ $\Delta 69$ /K70G ( $G\Delta 69G$ ) y $\Delta 67/T69G/K70R$ ( $\Delta 67GR$ ) en la actividad fosforolítica de la RT portadora de las TAMs M41L y T215Y | 121 |
| <b>6. CONCLUSIONES</b>  | 127 |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>  | 131 |

## **SUMMARY**



The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) is a multifunctional enzyme with RNA- and DNA- dependent DNA polymerase, RNase H, strand transfer and strand displacement activities. HIV-1 RT is an heterodimer composed of two subunits, p66 and p51, with subdomains termed fingers, palm, thumb and connection in both subunits and an RNase H domain in the larger subunit only. The  $\beta$ 3- $\beta$ 4 hairpin loop of the HIV-1 RT fingers subdomain interacts with the incoming dNTP and the template overhang, and is considered a hotspot for nucleoside analogue resistance mutations. Deletions in the  $\beta$ 3- $\beta$ 4 loop of HIV-1 RT are associated with the emergence of multidrug resistance. Common mutational patterns involve the deletion of Asp67 ( $\Delta$ 67) and mutations T69G and K70R, usually associated with thymidine analogue resistance-associated mutations (TAMs), while the deletion of Thr69 ( $\Delta$ 69) appears together with mutations of the Q151M complex. We have studied the effect of  $\Delta$ 69 in a multidrug-resistant sequence background (including the Q151M complex and substitutions K103N, Y181C, M184V, and G190A) and in a WT sequence context, under steady- and pre-steady-state conditions. Furthermore, we studied the effect of deleting codons 67 and 69 in RTs bearing TAMs M41L and T215Y, or K219E.

Firstly, we show that the Q151M complex accounts for most of the loss of susceptibility shown by the multidrug-resistant RTs, while mutation K103N generates high-level resistance to efavirenz and other NNRTIs. In addition, we demonstrate that mutations outside the NNRTI binding pocket (e.g. A376S) can influence resistance. A376S confers low-level resistance to nevirapine, due to a reduced affinity for the inhibitor, and affects template-primer binding.

Transient kinetics have been used to demonstrate that  $\Delta$ 69 in a WT sequence context increases 3TC resistance through a 3TCTP *versus* dCTP discrimination mechanism. In comparison with the WT RT, the  $\Delta$ 69 RT showed decreased ability to excise primers terminated with AZTMP in the presence of ATP or PPi. These data support the role of the excision mechanism in mediating AZT hypersusceptibility. We also demonstrate that the deletion has no effect on resistance to foscarnet. Furthermore, the introduction of deletion  $\Delta$ 69 in a sequence bearing TAMs M41L and T215Y resulted in a lower ATP-dependent phosphorolytic activity on primers terminated with AZTMP or d4TMP. Interestingly, the  $\Delta$ 67 complex ( $\Delta$ 67/T69G/K70R) showed significant ATP-mediated excision. This complex also increased excision activity on thymidine analogue-terminated primers, when introduced in a sequence containing TAMs M41L and T215Y. Secondary mutations, such as K219E (a TAM-2 pathway mutation) had no effect on rescue reactions catalyzed by the  $\Delta$ 67 RT, while its introduction in the  $\Delta$ 69 RT led to a decrease of its PPi-dependent excision activity on both AZT- and d4T-terminated primers. Structural changes in the  $\beta$ 3- $\beta$ 4 loop generated by these deletions can modify the accessibility of the PPi donor to the terminating nucleotide at the 3' end of the primer. We suggest that the evolutionary patterns followed by  $\Delta$ 69 and  $\Delta$ 67 can be explained by their role in the excision mechanism mediating resistance to nucleoside analogues.





## **1.INTRODUCCIÓN**



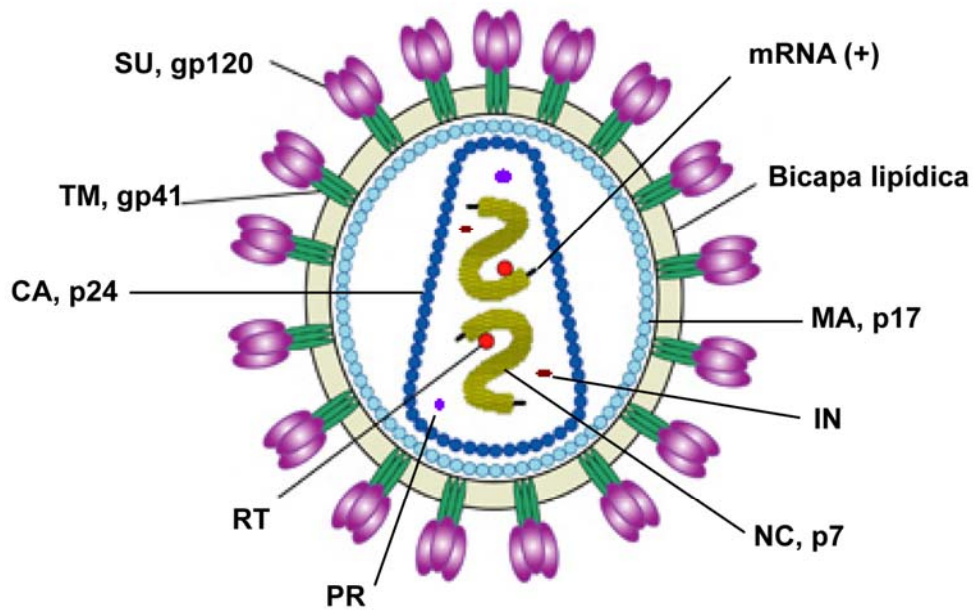
## 1.1 El virus de la inmunodeficiencia humana

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) fue identificado como el agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en 1983 (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 1984; Popovic *et al.*, 1984). Es un miembro del género *Lentiviridae*, el cual incluye a los retrovirus que poseen genomas complejos, cuyo material genético se encuentra en forma de ácido ribonucleico (RNA) monocatenario. Tras la infección de la célula, el RNA genómico se convierte en ácido desoxirribonucleico (DNA) de doble cadena, que posteriormente se integra en el genoma celular (Baltimore, 1970; Temin y Mizutani, 1970).

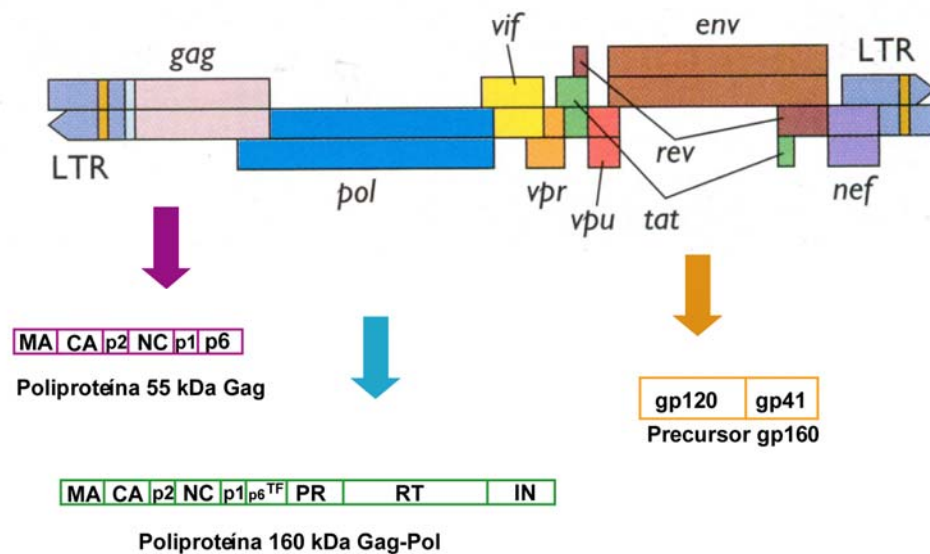
Al igual que otros lentivirus, la envuelta del VIH-1 está constituida por una bicapa lipídica derivada de la célula hospedadora. En la envuelta se encuentran dos glicoproteínas codificadas en el genoma del virus. La glicoproteína gp120 (SU) está expuesta hacia el exterior de la superficie del virión y se encuentra anclada al virus por medio de interacciones con la proteína transmembrana (TM, gp41). En el interior del virión está la proteína de la matriz (MA, p17) y en el centro se localiza una cápsida cónica constituida principalmente por la proteína p24 (CA). La cápsida contiene dos copias del genoma del virus, que se estabiliza como un complejo ribonucleoproteico junto con la proteína de la nucleocápsida (NC, p7). Además, el genoma del VIH-1 contiene genes que codifican para tres enzimas esenciales en su ciclo vital: la proteasa (PR), la retrotranscriptasa (RT) y la integrasa (IN). Por último, existen seis proteínas accesorias, tres de ellas están ubicadas dentro de los viriones (Nef, Vif y Vpr), y las otras tres (Rev, Tat y Vpu) se expresan en la célula hospedadora y no se empaquetan en el virus (**Figura 1A**) (revisado en: Turner y Summers, 1999; Adamson y Freed, 2007).

El genoma del VIH-1 tiene un tamaño aproximado de 9,8 Kb. Se encuentra flanqueado en sus extremos 3' y 5' por dos extremos repetitivos largos (LTRs), formados por las regiones U3, R y U5, responsables del inicio de la retrotranscripción y de la poliadenilación del RNA mensajero (RNAm) vírico (revisado en Kilaeski *et al.*, 2009). El VIH-1 presenta en su genoma tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*), tres genes reguladores (*tat*, *rev* y *nef*) y tres genes accesorios, denominados *vif*, *vpr* y *vpu*. Tres de ellos codifican para las poliproteínas Gag, Pol (sintetizada como Gag-Pol) y Env, comunes a todos los retrovirus, y que se procesan proteolíticamente para dar lugar a las proteínas que forman el virus maduro (**Figura 1B**).

**A**



**B**



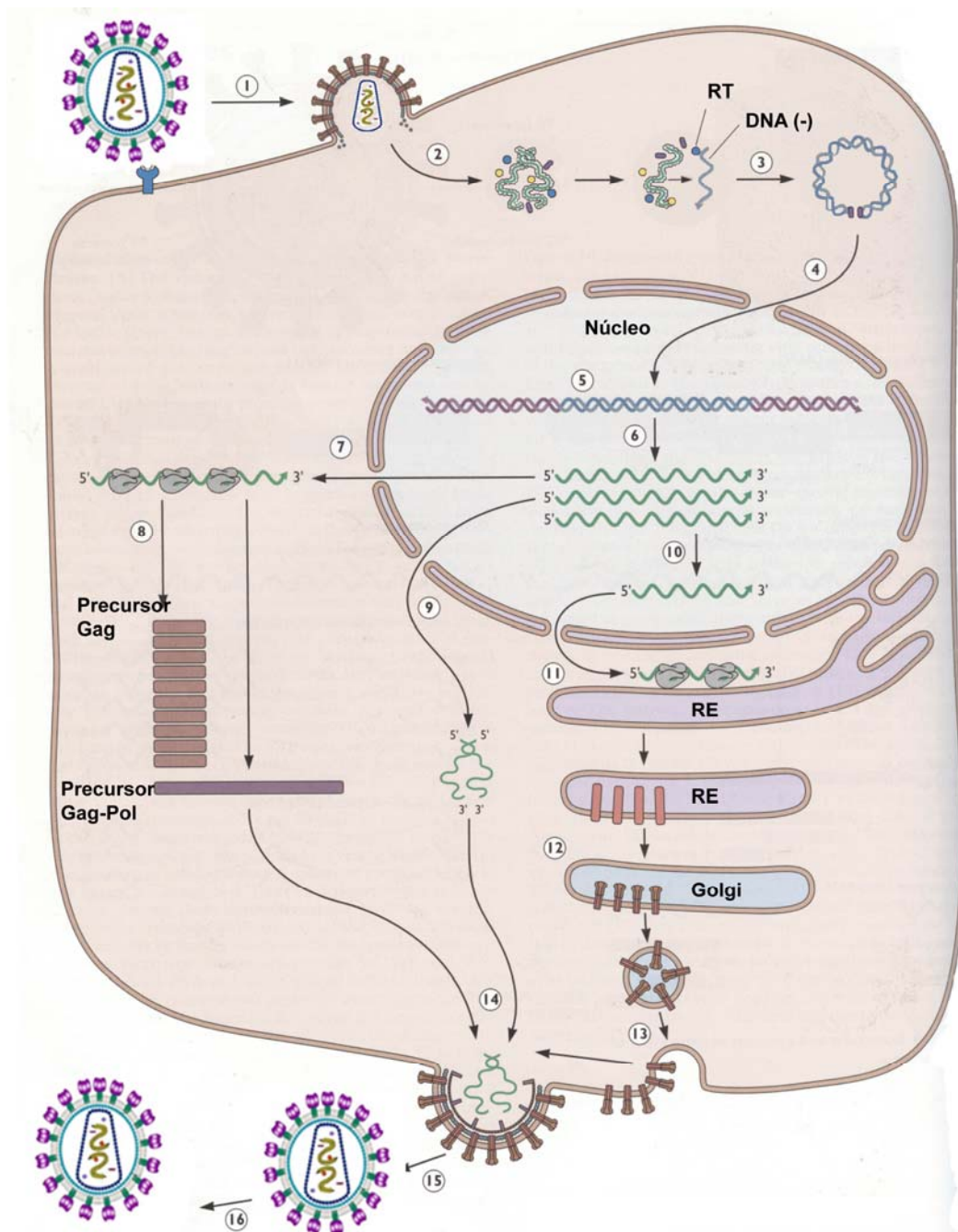
**Figura 1. (A) Representación de la estructura del VIH-1.** Se indica la localización de las proteínas más representativas del virión. **(B) Representación esquemática del genoma del VIH-1 y las poliproteínas virales a las que da lugar la expresión de sus genes.** En ambos extremos se muestran las secuencias repetidas largas (LTR), además de los genes *gag*, *pol* y *env*, que codifican las proteínas esenciales del virus, y los genes que codifican las proteínas reguladoras y accesorias. También se representan los productos de la expresión de los genes *gag*, *pol* y *env*, así como las proteínas a las que dan lugar después del procesamiento llevado a cabo por la proteasa viral y proteasas celulares. Figura adaptada de Flint *et al.*, 2001.

Las dos glicoproteínas de la envuelta (gp120 y gp41), codificadas por el gen *env*, se originan a partir de un mismo precursor de 160 kDa (gp160), que después de una serie de etapas de glicosilación se procesa por proteasas celulares (revisado en Prabakaran *et al.*, 2007). El gen *gag* se traduce como un precursor poliproteico de 55 kDa

denominado Gag. La PR viral procesa el precursor Gag, dando lugar a las proteínas MA, CA, NC y p6, y a dos péptidos espaciadores (p1 y p2). El gen *pol* se expresa como parte de una proteína de fusión Gag-Pol, que se genera por un mecanismo de cambio en la fase de lectura. Este hecho se da con una frecuencia del 5%, por lo que los productos del gen *pol* están en una proporción aproximada de 1:20 con respecto a los del gen *gag* (Jacks *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1988). Finalmente, el precursor Gag-Pol se procesa dando lugar a las proteínas estructurales del virus y a las enzimas virales PR, RT e IN (Figura 1A).

En la Figura 2 se muestran las etapas principales del ciclo de replicación del VIH. El ciclo comienza con el anclaje del virus a la superficie de la célula diana a través de interacciones entre la gp120 viral y el receptor específico del virus, la proteína CD4 (1) (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984; revisado en Yoon *et al.*, 2010). También están implicados en el reconocimiento y entrada del virus correceptores como CXCR4 y CCR5, que pertenecen a la familia de los receptores de quimioquinas (Dragic *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996; revisado en Alkhatib, 2009). Una vez que se ha producido la interacción de la gp120 con los receptores y correceptores se da el proceso de fusión de la envuelta del virus con la membrana celular de la célula hospedadora, que viene mediado por gp41 (2). Tras un proceso poco conocido, que implica la pérdida de la envuelta y de la cápsida viral, se completa la retrotranscripción (3), lo que da lugar a un DNA viral de doble cadena que se transporta al núcleo formando parte de un complejo de preintegración, cuya composición no se conoce bien pero que incluiría a las proteínas IN, MA, RT, Vpr y probablemente NC (4). Vpr sería la responsable de dirigir este complejo hasta el núcleo (Fouchier *et al.*, 1997; Nie *et al.*, 1998; Rücker *et al.*, 2004; revisado en Pandey *et al.*, 2009). A continuación, se produce la integración del DNA viral en el genoma de la célula hospedadora, catalizada por la IN (5).

El DNA integrado se denomina DNA proviral. Tras su integración en el genoma celular, el virus permanece en un estado latente (revisado en Margolis, 2010). Los fenómenos de reactivación y replicación requieren la activación de la célula hospedadora a través de varios factores entre los que se encuentran antígenos, mitógenos y citoquinas, entre otros (Shaw *et al.*, 1988; Laughlin y Pomerantz, 1994; revisado en Dahl *et al.*, 2010). La transcripción del DNA provírico por la RNA polimerasa II de la célula hospedadora (6) produce transcritos de RNA de tamaño completo. Algunas de estas moléculas se exportan del núcleo y se utilizan como RNAm (7), donde serán traducidos para producir las poliproteínas precursoras Gag y Gag-Pol (8). Otra parte de las moléculas de RNA se encapsidan en viriones (9) y otras se cortan y empalman



**Figura 2. Resumen del ciclo de replicación viral del VIH-1**, desde la adsorción y fusión con una célula hasta la producción y salida de nuevas partículas virales. Figura adaptada de Flint *et al.*, 2001.

(“splicing”) (10) dentro del núcleo para generar el RNA de las proteínas precursoras de la poliproteína Env (11). El RNA de *env* es traducido por ribosomas del retículo endoplásmico. Las proteínas derivadas del gen *env* se transportan a través del aparato de Golgi (12) donde se glicosilan y se procesan para formar la glicoproteína de superficie (SU, gp120) y la proteína transmembrana (TM, gp41) (Figura 1A). Estas proteínas maduras se transportan a la superficie de la célula infectada (13) (Freed y Martin, 1995;

Kräusslich y Welker, 1996; revisado en Freed y Mouland, 2006). Los componentes del virión inmaduro (RNA viral, precursores Gag y Gag-Pol y glicoproteínas de membrana) se ensamblan en sitios de gemación **(14, 15)** (Patnaik *et al.*, 2000). Posteriormente, las poliproteínas virales Gag y Gag-Pol se procesan por la PR viral para dar lugar a partículas infecciosas maduras **(16)** (Cimarelli y Darlix, 2002; Louis *et al.*, 2007; revisado en Bieniasz, 2009).

## 1.2 La RT del VIH-1

### 1.2.1 Características y función de la RT del VIH-1

La RT es la enzima clave en el ciclo biológico de los retrovirus, ya que cataliza la síntesis de DNA proviral de doble cadena a partir del RNA genómico monocatenario del virus (veánse revisiones recientes de Castro *et al.*, 2006; Basavapathruni y Anderson, 2007; Sarafianos *et al.*, 2009). La RT es una enzima multifuncional que presenta actividades DNA polimerasa dependiente de RNA y de DNA y actividad endonucleasa [ribonucleasa H (RNasa H)], además de capacidad de cambio de molde y de desplazamiento de cadena.

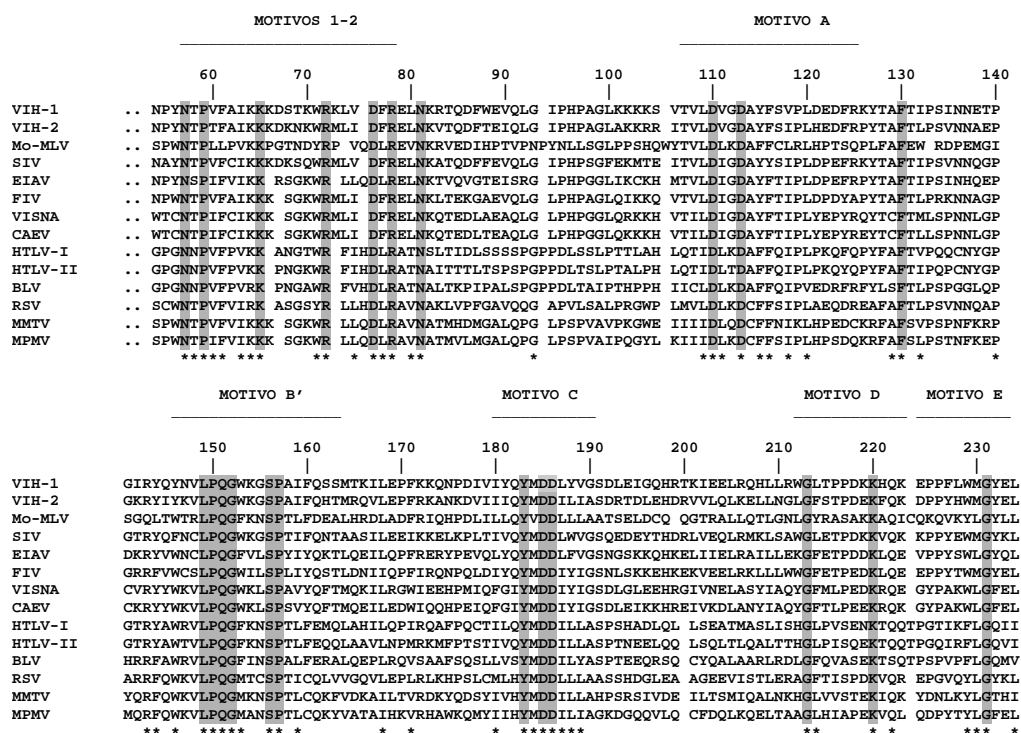
La RT del VIH-1 es un heterodímero asimétrico, constituido por dos subunidades de 66 y 51 kDa denominadas p66 y p51, respectivamente (di Marzo Veronese *et al.*, 1986; Lightfoote *et al.*, 1986). Aunque no se conoce con exactitud cuáles son los intermediarios en el procesamiento de Gag-Pol que llevan a la formación del heterodímero funcional p66/p51, se sabe que *in vitro*, homodímeros p66/p66 pueden convertirse en heterodímeros p66/p51 por acción de la PR viral. Esta enzima realiza un corte endoproteolítico, entre los aminoácidos 440 y 441, en una de las dos cadenas que forman el homodímero.

La subunidad p66 de la RT contiene los sitios activos para las dos actividades enzimáticas de la enzima (DNA polimerasa y RNasa H). El dominio DNA polimerasa se encuentra situado en la región N-terminal, y el dominio RNasa H abarca los últimos 120 aminoácidos del extremo C-terminal. Ambos dominios catalíticos están conectados por una estructura denominada “connection”. Esta región es sensible a la acción de la PR (Arts y Wainberg, 1996; Hottiger y Hübscher, 1996). Por otro lado, la subunidad p51 juega un papel estructural. Se ha observado que p51 contribuye a la estabilidad del heterodímero, manteniendo la conformación correcta de p66 durante el inicio de la retrotranscripción (Arts *et al.*, 1996; Depollier *et al.*, 2005; Upadhyay *et al.*, 2010).

También parece estar implicada en el proceso de unión de la RT al complejo molde-iniciador (Harris *et al.*, 1998; Pandey *et al.*, 2001).

## 1.2.2 Motivos conservados en DNA y RNA polimerasas

Las DNA y RNA polimerasas presentan homología estructural y secuencias comunes a muchas de ellas, a pesar de las diferencias en su estructura primaria (Argos, 1988; Bruenn, 2003; Delarue *et al.*, 1990; Sonntag y Darai, 1995). En la **Figura 3** se muestran secuencias de aminoácidos de varias RTs de retrovirus, en las que se indican los motivos conservados presentes en DNA y RNA polimerasas.



**Figura 3. Alineamientos de secuencias de RTs de retrovirus.** Se muestran los motivos conservados 1-2, A, B', C, D y E del dominio polimerasa. La numeración corresponde a la secuencia de la RT del VIH-1. Los residuos conservados se indican mediante un asterisco bajo el alineamiento. Los aminoácidos estrictamente conservados se encuentran sombreados. Las abreviaturas utilizadas son: VIH-1, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1; VIH-2, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2; Mo-MLV, virus Moloney de la leucemia de ratón; SIV, virus de la inmunodeficiencia de simios; EIAV, virus de la anemia infecciosa equina; FIV, virus de la inmunodeficiencia felina; VISNA, virus Visna; CAEV, virus de la encefalitis artrítica de cabra; HTLV-I, virus de la leucemia de células T humana tipo I; HTLV-II, virus de la leucemia de células T humana tipo II; BLV, virus de la leucemia bovina; RSV, virus del sarcoma de Rous; MMTV, virus del tumor mamario de ratón; MPMV, virus Mason-Pfizer de monos. Figura tomada de Menéndez-Arias *et al.*, 2002a.

Existen dos motivos, denominados A y C que se caracterizan por poseer cada uno un residuo de ácido aspártico muy conservado presente en todas las polimerasas. Los motivos D y E por otro lado, sólo se encuentran en las polimerasas dependientes de RNA (Joyce y Steitz, 1995; Sousa, 1996; Willis *et al.*, 2002). Además de los motivos A-E,

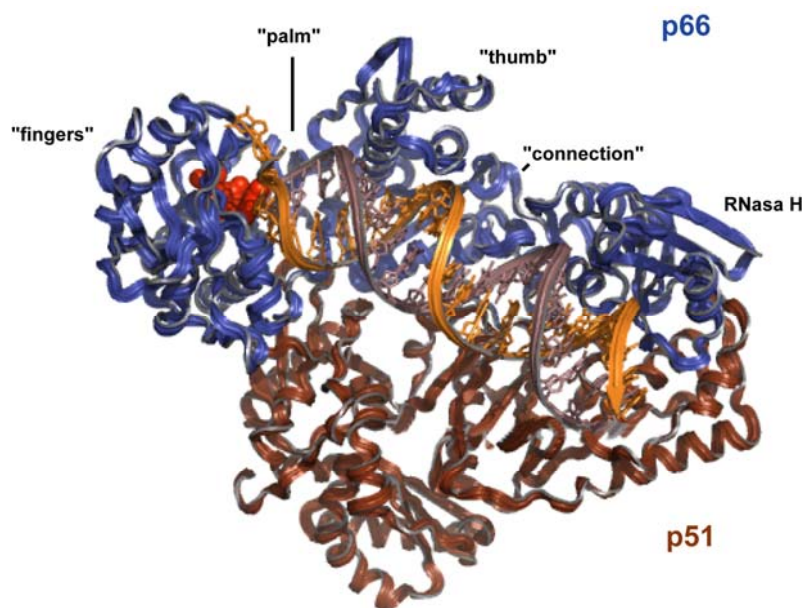


existen otros dos motivos, denominados 1-2, que se encuentran conservados en RTs de retrovirus, DNA polimerasas dependientes de RNA y en numerosos retroelementos (revisado en Menéndez-Arias, 2002a).

### 1.2.3 Estructura de la RT

La estructura cristalográfica de la RT del VIH-1 ha sido determinada en ausencia de ligando (Esnouf *et al.*, 1995; Rodgers *et al.*, 1995; Hsiou *et al.*, 1996), asociada a complejos RNA/DNA portadores de varios residuos de purina (polipurina) (Sarafianos *et al.*, 2001), asociada a inhibidores análogos a nucleótido como el tenofovir (Tuske *et al.*, 2004), asociada a inhibidores no análogos a nucleósido (Kohlstaedt *et al.*, 1992; Smerdon *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 1995a,b; Ren *et al.*, 1995a,b; Das *et al.*, 1996; Hopkins *et al.*, 1996; Esnouf *et al.*, 1997; Hsiou *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 1998a,b, 2000a,b,c, 2004 ; Himmel *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2005, 2007, 2008; Ren *et al.*, 2008; Kertesz *et al.*, 2010; Landson *et al.*, 2010) o asociada a complejos molde-iniciador formados por DNA heteropolimérico (Jacobo-Molina *et al.*, 1993; Ding *et al.*, 1997; Sarafianos *et al.*, 1999b; Tu *et al.*, 2010). También se ha obtenido la estructura de la RT acomplejada con un molde-iniciador DNA/DNA heteropolimérico y el dNTP entrante (Huang *et al.*, 1998).

Los análisis estructurales llevados a cabo con la RT del VIH-1 han revelado que el dominio polimerasa de la enzima contiene 4 subdominios comunes a p66 y p51 denominados “fingers” (residuos 1-85 y 118-155), “palm” (residuos 86-177 y 156-236), “thumb” (237-318) y “connection” (319-426) (Kohlstaedt *et al.*, 1992; Jacobo-Molina *et al.*, 1993) y sólo en la subunidad p66, se encuentra también el dominio RNasa H (**Figura 4**). Sin embargo, el plegamiento de los subdominios de la subunidad p51 ocurre de forma diferente al de la subunidad p66, a pesar de que sus secuencias de aminoácidos son idénticas hasta el residuo Phe440. Como en otras DNA polimerasas, el empaquetamiento de los subdominios de p66 da lugar a una estructura que se asemeja a una mano derecha abierta, creando una hendidura donde el complejo molde-iniciador interacciona. Esta hendidura está formada por residuos muy conservados en los subdominios “fingers” y “palm” junto con dos hélices  $\alpha$  del subdominio “thumb”, que posicionan al complejo molde-iniciador en la orientación adecuada para la catálisis.

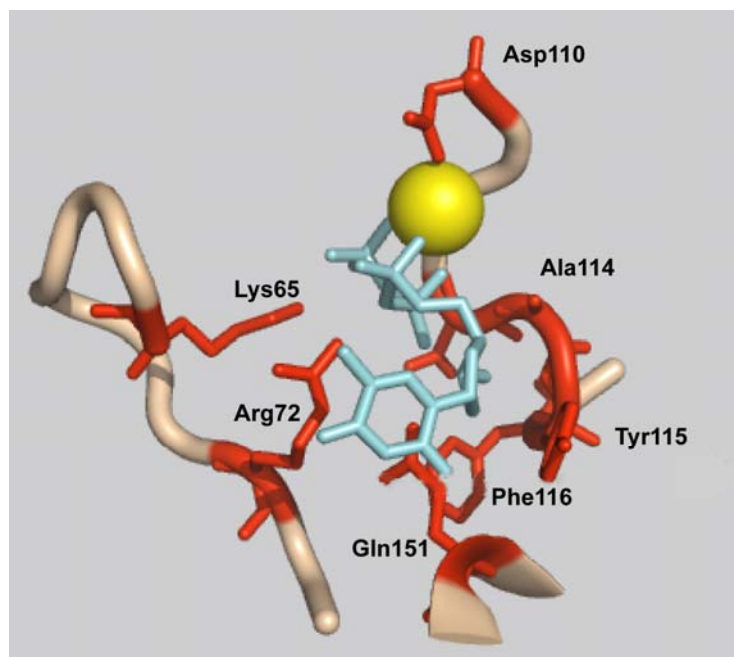


**Figura 4. Estructura de la RT del VIH-1 formando un complejo ternario con un molde-iniciador DNA/DNA heteropolimérico y dTTP (PDB 1RTD) (Huang *et al.*, 1998).** Se muestran los dominios DNA polimerasa (constituidos por los subdominios “fingers”, “palm”, “thumb”) y RNasa H, unidos entre sí a través del subdominio “connection”. En marrón aparece representada la subunidad p51 de la RT. En el complejo molde-iniciador, la cadena que forma el molde se representa en naranja y la que forma el iniciador en morado claro. En rojo se muestra el nucleótido trifosfato entrante, dTTP. Esta figura se ha realizado con el programa “PyMOL Molecular Graphics System” (DeLano Scientific).

En el centro activo se localizan tres residuos de ácido aspártico, Asp110, Asp185 y Asp186, que forman la tríada catalítica, imprescindibles para que se lleve a cabo la reacción de polimerización (Larder *et al.*, 1987; Le Grice *et al.*, 1991; Lowe *et al.*, 1991; Boyer *et al.*, 1992; Hostomsky *et al.*, 1992; Kaushik *et al.*, 1996). Estos residuos catalíticos ocupan una posición interna en la subunidad p51 debido a que en ella, el subdominio “fingers” se cierra sobre el subdominio “palm” (revisado en Hottiger y Hübscher, 1996; Menéndez-Arias, 2002a; Sarafianos *et al.*, 2009).

En la estructura cristalográfica de la RT unida a un complejo molde-iniciador DNA/DNA heteropolimérico y al dNTP entrante (Huang *et al.*, 1998) se observan diversos residuos en torno al centro activo que podrían tener un papel importante en la actividad DNA polimerasa, a través de posibles interacciones con el complejo molde-iniciador, el dNTP entrante, y otros residuos de la RT. El grupo trifosfato del dNTP se encuentra coordinado con las cadenas laterales de los residuos Lys65 y Arg72, las cadenas principales de los residuos Asp110 y Ala114, y con un átomo de magnesio (**Figura 5**). Un segundo átomo de magnesio contacta con las cadenas laterales de los Asp110, Asp185 y Asp186, que forman la tríada catalítica. Las cadenas laterales de la Arg72 y la Gln151 se sitúan en la cara externa de la base nitrogenada del dNTP entrante, mientras que su anillo de ribosa se encuentra en una hendidura definida por las cadenas laterales de los residuos Asp113, Tyr115, Phe116 y Gln151. Otros residuos como Leu74, Pro157,

Phe160, Tyr183 y Met184 podrían afectar también a la unión del dNTP, aunque de manera indirecta (Huang *et al.*, 1998).



**Figura 5. Estructura del sitio de unión del dNTP en la estructura de la RT del VIH-1.** En rojo se muestran los residuos más relevantes para la unión del dNTP (que se muestra en azul claro). El átomo de  $Mg^{2+}$  que se coordina con el dNTP se representa en amarillo. Un segundo átomo de  $Mg^{2+}$  se encuentra contactando los residuos Asp110, Asp185 y Asp186 que forman la triada catalítica. Las coordenadas han sido obtenidas del Protein Data Bank (código 1RTD) (Huang *et al.*, 1998). Esta figura se ha realizado con el programa “PyMOL Molecular Graphics System” (DeLano Scientific).

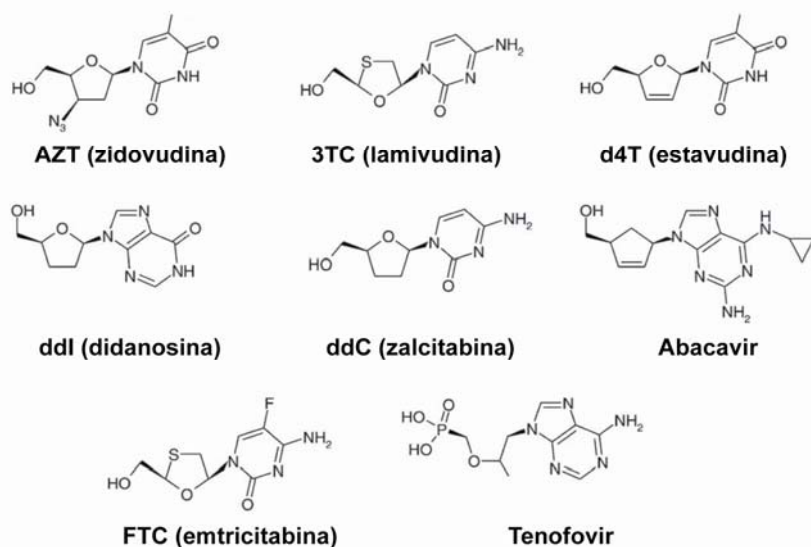
### 1.3 Tratamiento antirretroviral

La RT es una diana crucial en el desarrollo de fármacos antirretrovirales. Los inhibidores análogos y no análogos a nucleósidos de la RT (NRTIs y NNRTIs, respectivamente) se utilizan habitualmente en terapias contra la infección del VIH (revisado en: Vivet-Boudou *et al.*, 2006; Ren y Stammers, 2008; Sluis-Cremer y Tachedjian, 2008; Menéndez-Arias, 2010) (**Figura 6**).

En la actualidad, la terapia HAART (del inglés, “highly active antiretroviral therapy”) es la más utilizada para el tratamiento contra el VIH-1 y consiste en una combinación de inhibidores dirigidos contra dos o más dianas terapéuticas. Las terapias HAART más frecuentes incluyen uno o dos NRTIs, un NNRTI y/o un inhibidor de la proteasa, y en ocasiones, un inhibidor de la fusión o un inhibidor de la integrasa. Un ejemplo de terapia HAART muy utilizada actualmente es la basada en tenofovir, emtricitabina y efavirenz, y se comercializa bajo el nombre de Atripla.

Las terapias combinadas han mejorado notablemente la duración y calidad de vida de los pacientes infectados por el VIH (Palella *et al.*, 1998; Carpenter *et al.*, 2000). Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos se encuentra limitada por factores como la tolerabilidad, la toxicidad a largo plazo y la adherencia a los fármacos. El uso prolongado de fármacos antirretrovirales en los tratamientos clínicos de pacientes infectados que han sufrido fracasos repetidos y los cambios frecuentes en las terapias antirretrovirales se asocian con la acumulación de mutaciones de resistencia, provocando un aumento en la resistencia fenotípica y en la selección de variantes multirresistentes del VIH-1 (revisado en Johnson *et al.*, 2009; Menéndez-Arias, 2010).

## A



## B

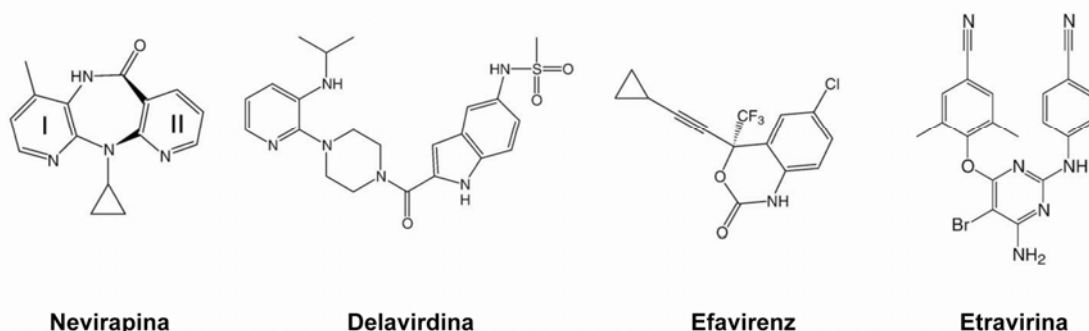


Figura 6. Estructuras químicas de NRTIs (A) y NNRTIs (B) aprobados para su uso clínico.

La aparición de resistencia a fármacos antirretrovirales puede darse aún cuando los niveles de replicación viral son bajos o modestos. La selección de las mutaciones de resistencia se explica por la baja fidelidad de la RT del VIH-1, la alta tasa de replicación del virus y la alta tasa de recombinación mediada por la RT. La resistencia a fármacos

antirretrovirales se genera a través de la acumulación de una o más mutaciones en la región codificante de la RT del VIH-1. Por lo general, las mutaciones de resistencia aparecen como consecuencia de una pérdida de “fitness” viral y a veces vienen acompañadas de mutaciones compensatorias que mejoran la capacidad replicativa del virus (revisado en Menéndez-Arias *et al.*, 2003; Martínez-Picado y Martínez, 2008).

### 1.3.1 NRTIs

Actualmente, son siete los NRTIs aprobados para el tratamiento de pacientes infectados por el VIH (**Figura 6A**):  $\beta$ -D-(+)-3'-azido-3'-desoxitimidina (zidovudina, **AZT**),  $\beta$ -D-(+)-2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxitimidina (estavudina, **d4T**),  $\beta$ -L-(-)-2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina (lamivudina, **3TC**),  $\beta$ -L-(-)-2',3'-didesoxi-5-fluoro-3'-tiacitidina (emtricitabina, **FTC**),  $\beta$ -D-(+)-2',3'-didesoxiinosina (didanosina, **ddI**),  $\beta$ -D-(+)-2',3'-didesoxicitidina (zalcitabina, **ddC**) y (-)-(1S,4R)-4-[2-amino-6-(ciclopropilamino)-9H-purin-9-il]-2-ciclopenten-1-metanol (**abacavir**), así como un inhibidor análogo a nucleótido derivado de fosfonato acíclico [R-9-(2-fosfonometoxipropil)adenina, **tenofovir**], comercializado como tenofovir disoproxil fumarato. Además, existen otros NRTIs en distintas fases de desarrollo preclínico (Gu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; revisado en Jochmans, 2008; Cahn y Wainberg, 2010).

Los NRTIs actúan como terminadores de cadena, ya que carecen de un grupo hidroxilo (3'OH) en su anillo de ribosa, y por lo tanto su incorporación bloquea la elongación de la cadena de DNA que se está sintetizando. Dentro de la célula, estos inhibidores deben ser fosforilados por quinasas celulares a su forma activa 5'-trifosfato, para así poder actuar como inhibidores competitivos del sustrato natural de la RT y ser incorporados en el DNA recién sintetizado.

La eficacia terapéutica de los NRTIs está condicionada, en parte, por la eficiencia del proceso de activación de los fármacos por las quinasas celulares (Merta *et al.*, 1992; Kakuda, 2000; De Clercq y Holy, 2005; Ray, 2005; Schinazi *et al.*, 2006; Bazzoli *et al.*, 2010). Otros factores que limitan la capacidad de los NRTIs para reducir la replicación viral son su absorción, transporte, metabolismo y su incorporación al DNA. Además, el tratamiento prolongado con éstos fármacos se asocia con cuadros clínicos que incluyen hiperlactemia y acidosis láctica, neuropatías, pancreatitis y lipoatrofia (Nolan y Mallal, 2004; Hammond *et al.*, 2010). Algunos de estos efectos adversos parecen estar relacionados con la inhibición de la DNA polimerasa mitocondrial  $\gamma$  (Lewis *et al.*, 2003; Kohler y Lewis, 2007). Esta polimerasa es responsable del mantenimiento del DNA

mitocondrial y por lo tanto, su inhibición altera la estructura y función de la mitocondria, lo que conlleva la pérdida de su función bioenergética.

### 1.3.1.1 Resistencia a NRTIs

El primer compuesto utilizado en terapia contra la infección por el VIH-1, fue el AZT. Se observó que la sensibilidad a este fármaco disminuía en pacientes sometidos a monoterapia durante 6 meses o más (Larder *et al.*, 1989a,b). Las primeras mutaciones de resistencia a AZT descritas fueron M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y y K219Q (Larder y Kemp, 1989). Tras la incorporación a las terapias anti-VIH de nuevos fármacos de este grupo (como por ejemplo, ddC, ddI o d4T), se identificaron muchas otras mutaciones de resistencia. Curiosamente, en los pacientes sometidos a tratamiento con el d4T, se observaba la aparición de las mismas mutaciones de resistencia que con el AZT (Lin *et al.*, 1994; Izopet *et al.*, 1999; Pellegrin *et al.*, 1999; Coakley *et al.*, 2000). Estas mutaciones se denominaron “mutaciones de resistencia asociadas a timidina” (TAMs) y en el 10% de los casos aparecen con el tratamiento con ddI (Demeter *et al.*, 1995; Winters *et al.*, 1997). Las TAMs afectan a residuos de los subdominios “fingers” y “palm” de la RT.

Las mutaciones de resistencia a NRTIs aparecen más frecuentemente en residuos próximos al sitio de unión del nucleótido o que interaccionan con el dNTP entrante. Por ejemplo, mutaciones de resistencia tales como K65R, T69G y L74V se encuentran en la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  ( $\beta 3$ - $\beta 4$  “hairpin loop”), ubicada en el subdominio “fingers” de la subunidad p66 y que interacciona con el dNTP entrante. Las mutaciones que forman el “complejo de la Q151M” (A62V, V75I, F77L, F116Y y Q151M) afectan a la estructura del sitio de unión del dNTP entrante, mientras que la mutación M184V confiere niveles altos de resistencia al 3TC y afecta las interacciones con el anillo de ribosa del dNTP entrante. En la **Figura 7** se muestra un resumen con las mutaciones de resistencia en la RT del VIH-1 asociadas al uso de los NRTIs.

La resistencia a NRTIs puede darse a través de dos mecanismos moleculares diferentes, bien por alteraciones en la eficiencia de discriminación entre los dNTPs naturales y los NRTIs trifosforilados, o bien por la adquisición por parte de la RT de una actividad fosforolítica que permite la escisión de los inhibidores una vez incorporados en la cadena creciente de DNA. Estos mecanismos de resistencia no son mutuamente excluyentes y por lo general, la actividad de escisión promovida por la presencia de TAMs

es modulada por mutaciones que están involucradas en la discriminación entre dNTPs y NRTIs fosforilados (por ejemplo, K65R o L74V).

### A) Discriminación en la incorporación de NRTIs trifosforilados frente a dNTPs

Mediante este mecanismo se reduce la capacidad de la RT para incorporar al DNA la forma trifosfato del inhibidor. En general, la adquisición de la resistencia viene dada por la aparición de una o más mutaciones que confieren a la RT la habilidad de discriminar entre el sustrato natural (dNTP) y la forma trifosfato del NRTI. De esta forma, la resistencia está normalmente asociada con un descenso de la eficiencia catalítica ( $k_{pol}/K_d$ ) para la incorporación del NRTI trifosforilado. Esto puede ocurrir por una pérdida de afinidad por el inhibidor (aumento en la  $K_d$ ) y/o por una reducción en su velocidad de incorporación (descenso en la  $k_{pol}$ ).

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| Multirresistencia asociada a NRTIs: TAMs     | M 41 D 67 K 70 L T K 210 215 219   |
|  | L N R W Y/F Q/E                    |
|  | Insersión                          |
| Multirresistencia: Complejo 69SS             | M 41 A 62 69 70 K 210 215 219      |
|  | L V R W Y/F Q/E                    |
| <sup>a</sup> Multirresistencia: Complejo 151 | A 62 V F 75 77 F 116 Q 151         |
|  | V I L Y M                          |
| Zidovudina (AZT)                             | M 41 D 67 K 70 L T K 210 215 219   |
|  | L N R W Y/F Q/E                    |
| Estavudina (d4T)                             | M 41 D 67 K 70 V L T K 210 215 219 |
|  | L N R I W Y/F Q/E                  |
| Didanosina (ddI)                             | K 65 L 74 R V                      |
| Zalcitabina (ddC)                            | K 65 T 69 74 R D V                 |
| Abacavir                                     | K 65 L 74 Y 115 M 184              |
|  | R V F V                            |
| Lamivudina(3TC)                              | K 65 L 184 R V/I                   |
| Tenofovir                                    | K 65 K 70 R E                      |
| Emtricitabina (FTC)                          | K 65 M 184 R V/I                   |

**Figura 7. Mutaciones en la RT asociadas a resistencia a NRTIs.** ▼ indica una inserción de dos aminoácidos (Ser-Ser, Ser-Ala o Ser-Gly) entre los codones 69 y 70. Figura adaptada de Johnson *et al.*, 2009.

La **Tabla 1** muestra una serie de mutaciones individuales que producen resistencia alterando la capacidad de discriminación entre nucleótidos naturales y NRTIs

trifosforilados, cuando están en un contexto de secuencia “wild type” (WT). Estas mutaciones se encuentran normalmente cerca del centro activo de la enzima, en el sitio de unión del dNTP. En ocasiones, los niveles de resistencia se ven incrementados cuando estas mutaciones se encuentran en combinación o asociadas con otras mutaciones secundarias que aumentan el efecto de las mutaciones principales.

**Tabla 1. Mutaciones en la RT que aumentan la capacidad de discriminación entre NRTIs fosforilados y dNTPs.**

| Mutación     | Localización (subdominio)                       | Resistencia                                  | Mecanismo dependiente de | Comentarios  | Ref.        |
|--------------|---|--|--------------------------|--|-------------|
| <b>K65R</b>  | “fingers”<br>(horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ ) | ddA, 3TC, FTC<br>tenofovir, ddI,<br>abacavir | $k_{pol}$                | Suprime la resistencia a AZT   | 1-6         |
|              |   | ddC  | $k_{pol}$ - $K_d$        |  |             |
| <b>K70E</b>  | “fingers”<br>(horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ ) | tenofovir                                    | $k_{pol}$                | Su aparición precede a K65R y se excluyen mutuamente<br>Mecanismo mixto: discriminación-escisión | 6-7         |
| <b>L74V</b>  | “fingers”<br>(horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ ) | ddNTPs,<br>abacavir                          | $k_{pol}$ - $K_d$        | Disminuye la capacidad replicativa del virus<br>Suprime la resistencia a AZT                     | 2, 8-14     |
| <b>V75I</b>  | “fingers”<br>(horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ ) | aciclovir <sup>a</sup>                       | $k_{pol}$                | Mutación accesoria del complejo de la Q151M  | 15-16       |
| <b>V75T</b>  | “fingers”<br>(horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ ) | d4T  | $K_d$                    | Mecanismo mixto: discriminación-escisión   | 1, 17-19    |
| <b>Q151M</b> | “palm”  | multirresistencia                            | $k_{pol}$                | Mutación accesoria del complejo de la Q151M  | 3, 20-25    |
| <b>M184V</b> | “palm”  | 3TC/FTC                                      | $k_{pol}$ - $K_d$        | Antagonista de K65R (suprime resistencia a tenofovir)  | 2, 3, 26-30 |
|              |   | abacavir                                     | $k_{pol}$ - $K_d$        |  |             |

Las referencias (ref.) corresponden a los siguientes artículos: (1) Selmi *et al.*, 2001; (2) Deval *et al.*, 2004a,b; (3) Deval *et al.*, 2005; (4) Feng *et al.*, 2006; (5) White *et al.*, 2006 (6) Sluis-Cremer *et al.*, 2007; (7) Kagan *et al.*, 2007; (8) Ueno *et al.*, 1997; (9) Martin *et al.*, 1993; (10) Sharma y Crumpacker, 1997; (11) Sharma y Crumpacker, 1999; (12) St Clair *et al.*, 1991; (13) Miranda *et al.*, 2005; (14) Frankel *et al.*, 2005; (15) McMahon *et al.*, 2008; (16) Tchesnokov *et al.*, 2009; (17) Lacey y Larder, 1994; (18) Petropoulos *et al.*, 2000; (19) Lennerstrand *et al.*, 2001; (20) Shirasaka *et al.*, 1995; (21) Ueno *et al.*, 1995; (22) Kaushik *et al.*, 2000; (23) Deval *et al.*, 2002; (24) Ray *et al.*, 2002a; (25) Frangeul *et al.*, 2008; (26) Feng y Anderson, 1999; (27) Sarafianos *et al.*, 1999a; (28) Wilson *et al.*, 1996; (29) Krebs *et al.*, 1997; (30) Ray *et al.*, 2002b.

<sup>a</sup> El aciclovir es un análogo a nucleósido que inhibe la replicación de herpes simplex. Inhibe la replicación del VIH-1 en pacientes coinfectados con herpes simplex. El aciclovir fosforilado actúa como terminador de cadena, inhibiendo a la RT del VIH-1 (Lisco *et al.*, 2008).



Dos ejemplos representativos de mutaciones que confieren resistencia a NRTIs a través de un mecanismo de discriminación son M184I/V y el complejo de la Q151M, que describimos con mayor detalle a continuación:

*i) M184V/I y su papel en resistencia a 3TC*

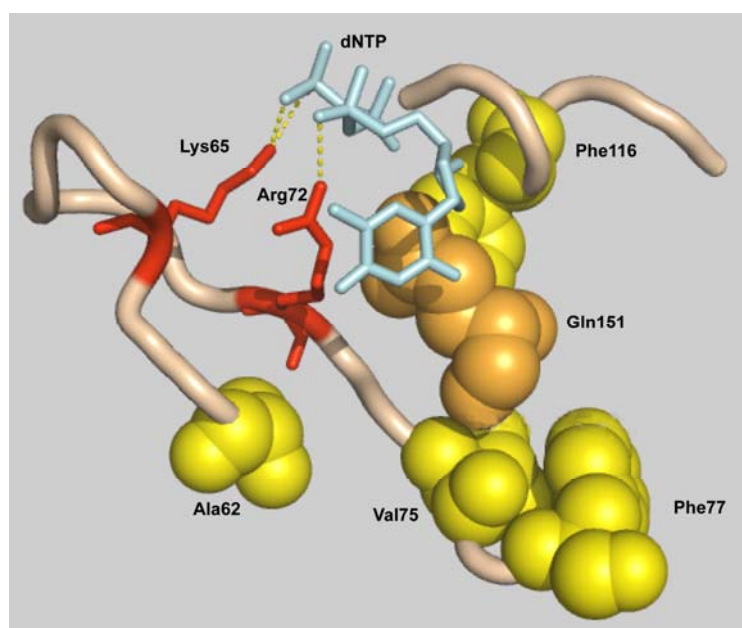
La Met184 está localizada en el subdominio “palm” de la RT, dentro del motivo catalítico altamente conservado “YMDD”. La cadena lateral de Met184 interacciona con el extremo 3’ del iniciador y el dNTP entrante (Huang *et al.*, 1998). La resolución de estructuras cristalográficas de la RT portadora del cambio M184I, en presencia y ausencia de un complejo molde-iniciador DNA/DNA, ha sugerido que la presencia de Ile (o eventualmente Val) en esta posición impide la unión del anillo oxatolano del 3TC, debido al mayor grosor de la cadena lateral del aminoácido que ocupa la posición 184 (Sarafianos *et al.*, 1999a). Esto da lugar a una disminución significativa de la eficiencia catalítica ( $k_{pol}/K_d$ ) de la RT mutante en la incorporación de 3TCTP al DNA naciente (Krebs *et al.*, 1997; Feng y Anderson, 1999; Deval *et al.*, 2004a,b, 2005; Kellinger y Johnson., 2010).

*ii) Multirresistencia a NRTIs mediada por el complejo de la Q151M*

La adquisición de resistencia a través de la vía de Q151M se observó por primera vez en virus de pacientes que habían recibido tratamiento con AZT y ddI. Los virus resistentes contenían los cambios de aminoácido A62V, V75I, F77L, F116Y y Q151M (Shirasaka *et al.*, 1995). La primera mutación en aparecer era Q151M y se observó que confería bajos niveles de resistencia a AZT, ddI, ddC, d4T, abacavir y tenofovir (Shirasaka *et al.*, 1995; Iversen *et al.*, 1996; Kavlick *et al.*, 1998; Paolucci *et al.*, 2004) y resistencia moderada a apricitabina (Gu *et al.*, 2006). Gln151 está localizada en el subdominio “palm” de la RT del VIH-1 y su cadena lateral interacciona con el dNTP entrante, contactando con la ribosa y la base nitrogenada del dNTP entrante (Huang *et al.*, 1998).

Las mutaciones de resistencia del complejo de la Q151M (A62V, V75I, F77L, F116Y y Q151M) afectan a la red de enlaces de hidrógeno entre el dNTP entrante y la RT (Huang *et al.*, 1998; revisado en Menéndez-Arias, 2010) (**Figura 8**). Estudios cinéticos en el estado estacionario demostraron que el cambio Q151M y las mutaciones acompañantes alteran el reconocimiento de los NRTIs (Ueno *et al.*, 1995; Kaushik *et al.*, 2000; Lennerstrand *et al.*, 2001). Estas observaciones se confirmaron posteriormente mediante la realización de ensayos en condiciones de estado pre-estacionario (Deval *et*

*al.*, 2002) (**Tabla 1**). El mecanismo de resistencia mediado por Q151M y sus mutaciones asociadas implica una reducción de la constante catalítica ( $k_{pol}$ ) de incorporación del análogo a nucleótido, como se ha demostrado para AZTTP frente a dTTP (Deval *et al.*, 2002), d4TTP frente a dTTP (Deval *et al.*, 2005), ddCTP frente a dCTP (Deval *et al.*, 2002) y carbovir-TP frente a dGTP (Ray *et al.*, 2002a). El descenso de la  $k_{pol}$  podría atribuirse a la pérdida de la red de interacciones establecida con el dNTP entrante. Las mutaciones del complejo de la Q151M confieren resistencia a múltiples análogos a nucleósido, pero no a nevirapina y otros NNRTIs.



**Figura 8.** Estructura del sitio de unión del dNTP entrante y localización de los aminoácidos implicados en el complejo de la Q151M. Las coordenadas han sido obtenidas del Protein Data Bank (código 1RTD) (Huang *et al.*, 1998). Esta figura se ha realizado con el programa “PyMOL Molecular Graphics System” (DeLano Scientific).

### B) Escisión de NRTIs

Estudios bioquímicos iniciales revelaron que el mecanismo de resistencia en RTs del VIH-1 resistentes a AZT (por ejemplo D67N/K70R/T215F/K219Q) no está basado en discriminación entre sustrato natural e inhibidor (Lacey *et al.*, 1992; Carroll *et al.*, 1994; Krebs *et al.*, 1997), sino que se debe a la adquisición por parte de la enzima resistente de una mayor capacidad para desbloquear el extremo 3' del iniciador a través de un mecanismo de fosforólisis dependiente de ATP o pirofostato (PPi) (Arion *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1999; Selmi *et al.*, 2003; Deval *et al.*, 2004a; revisado en Goldschmidt y Marquet, 2004; Sarafianos *et al.*, 2004; Menéndez-Arias, 2010). Esta reacción de escisión ocurre mediante el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo del PPi o de un grupo hidroxilo sustituyente del fosfato  $\gamma$  del nucleótido que actuaría como donador de PPi (Matamoros *et*

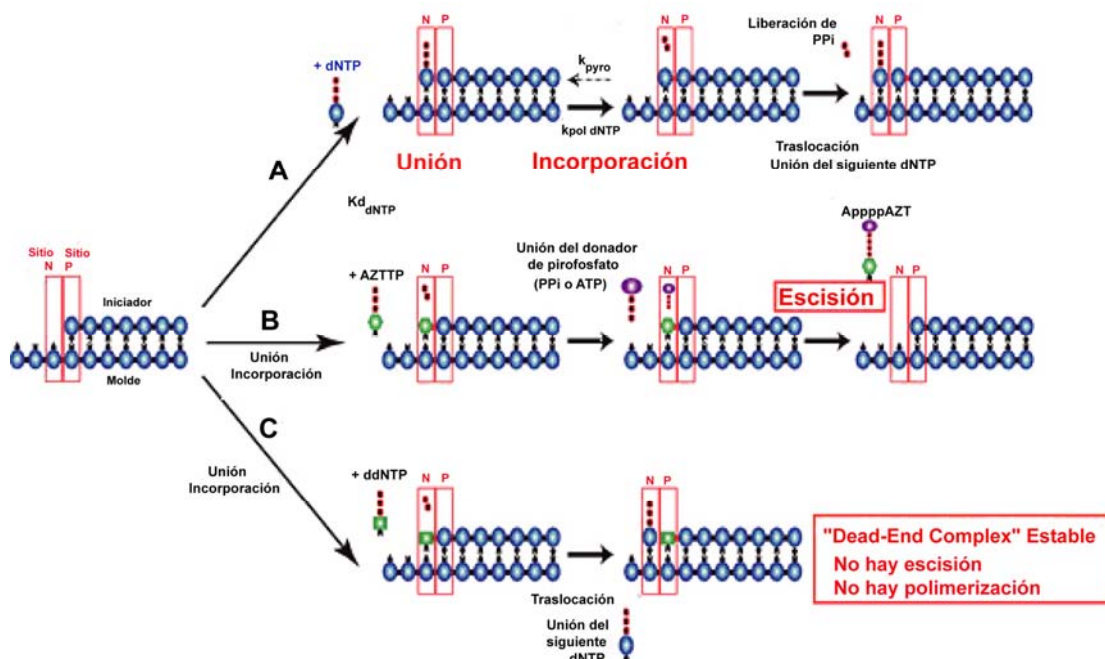
*al.*, 2005) sobre el enlace fosfodiéster terminal del iniciador bloqueado con AZT-monofosfato (AZTMP) (**Figura 9**).

La actividad de la reacción de escisión ha sido bien caracterizada *in vitro*. Estos estudios han mostrado que la eficiencia de la escisión depende de varios factores como: (i) la naturaleza de la hebra molde (RNA o DNA) (Rigourd *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 2003; Nikolenko *et al.*, 2005), (ii) el contexto de secuencia del molde de DNA o RNA (Meyer *et al.*, 2004, 2007), (iii) la concentración de  $Mg^{2+}$  (Goldschmidt *et al.*, 2006) y (iv) el análogo de nucleósido que bloquea el iniciador. Aunque los iniciadores bloqueados con AZT son muy buenos sustratos para la escisión mediada por ATP, otros análogos a nucleósido pueden ser eliminados de iniciadores bloqueados utilizando el mismo mecanismo. Se ha observado que los inhibidores análogos a timidina [por ejemplo, AZT, d4T y didesoxitimidina (ddT)] son los mejores sustratos de la reacción, mientras que los análogos a citidina [por ejemplo, ddC-monofosfato (ddCMP) y 3TC-monofosfato (3TCMP)] se escinden de manera muy ineficiente (Meyer *et al.*, 1999, 2000; Boyer *et al.*, 2001; Mas *et al.*, 2002; Naeger *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 2003).

Otro factor importante en la eficiencia de la escisión es la presencia del siguiente nucleótido complementario, lo que lleva a la formación de un complejo estable denominado “dead-end complex” que bloquea la reacción de escisión (Tong *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1999) (**Figura 9**). La escisión de d4T-monofosfato (d4TMP), ddT-monofosfato (ddTMP) y ddA-monofosfato (ddAMP) podría inhibirse a las concentraciones del siguiente nucleótido complementario presentes en la célula [concentración inhibitoria al 50% ( $CI_{50}$ ) = 0,5 - 25  $\mu M$ ] (Meyer *et al.*, 2000; Boyer *et al.*, 2001; Mas *et al.*, 2002). Sin embargo, el rescate de AZTMP no se inhibe a concentraciones fisiológicas de dNTP ( $CI_{50}$  > 0,25 mM). Estos datos explicarían por qué las TAMs confieren mayores niveles de resistencia a AZT que a d4T y ddl [cuyo metabolito activo es ddA-trisfosfato (ddATP)], en ensayos fenotípicos.

La colocación correcta del iniciador bloqueado con el inhibidor en su extremo 3' es otro factor importante en la reacción de escisión. Para que la reacción de escisión ocurra, el extremo 3' del iniciador bloqueado debe estar en el sitio N (“nucleotide binding site”), dando lugar a la formación de un complejo pre-translocado (complejo N) (Boyer *et al.*, 2001; Sarafianos *et al.*, 2002; Marchand y Götte, 2003; revisado en Goldschmidt y Marquet., 2004; Menéndez-Arias, 2008; Sarafianos *et al.*, 2009). La translocación al sitio P (“primer binding site”) ocurre después, tras la unión del dNTP y la liberación del PPi, formando un complejo post-translocado (complejo P). Ensayos de “footprinting” han

demonstrado que se establece un equilibrio dinámico entre la posición del extremo 3' del iniciador en los sitios N y P, antes de la unión del dNTP y después de la liberación del PPi (Marchand y Götte, 2003). Según este modelo, el siguiente dNTP complementario bloquea la reacción de escisión porque fuerza el equilibrio hacia el estado post-translocado (complejo P) (Marchand y Götte, 2003) (**Figura 9**). Por otro lado, estudios anteriores han revelado que las mutaciones de resistencia (TAMs) favorecen el rescate del inhibidor debido a que aumentan la proporción de iniciador en el estado pre-translocado (complejo N) (Meyer *et al.*, 1999, 2000; Mas *et al.*, 2002; Naeger *et al.*, 2002; Marchand y Götte, 2003).



**Figura 9. Representación esquemática de la reacción de polimerización y escisión llevada a cabo por la RT del VIH-1.** N y P representan el sitio N (nucleótido) y P ("primer") de la RT. **(A)** Incorporación del siguiente dNTP. El extremo del molde se encuentra en el sitio P y el dNTP entrante se une al sitio N. El fosfato  $\alpha$  del dNTP entrante se une a la cadena de DNA naciente, liberándose PPi cuando se forma el enlace nucleosídico. El extremo del iniciador se transloca al sitio P de tal forma que continúa el ciclo y un nuevo dNTP se puede incorporar. La eficiencia de la incorporación de un dNTP o cualquier análogo a dNTP depende de su afinidad por el complejo RT•molde-iniciador ( $K_d$ ) y de la tasa de incorporación ( $k_{pol}$ ). **(B)** Modelo de la reacción de escisión. La incorporación del AZTMP al DNA bloquea el iniciador impidiendo la unión del siguiente dNTP entrante. El iniciador bloqueado reside principalmente en el sitio N y el donador de pirofosfato (PPi o ATP) se puede unir de tal forma que el AZTMP se libera formando un dinucleótido tetrafosfato, AZTppppA (Meyer *et al.*, 1998). **(C)** Formación del "dead-end complex". Cuando un terminador de cadena distinto del AZTMP se incorpora, la translocación del iniciador al sitio P ocurre y el siguiente dNTP se une al sitio N. Debido a la ausencia del extremo 3'OH en el iniciador, el complejo se vuelve estable impidiendo que haya incorporación de nucleótido y que se dé la reacción de escisión (Tong *et al.*, 1997). Figura adaptada de Vivet-Boudou *et al.*, 2006.

#### i) Mutaciones de resistencia a análogos de timidina (TAMs)

Estudios llevados a cabo con mutantes de la RT del VIH-1 que llevan en su secuencia una, dos o más TAMs han mostrado que tanto las mutaciones D67N y K70R, localizadas en el subdominio "fingers" de la RT, como la mutación T215Y son necesarias

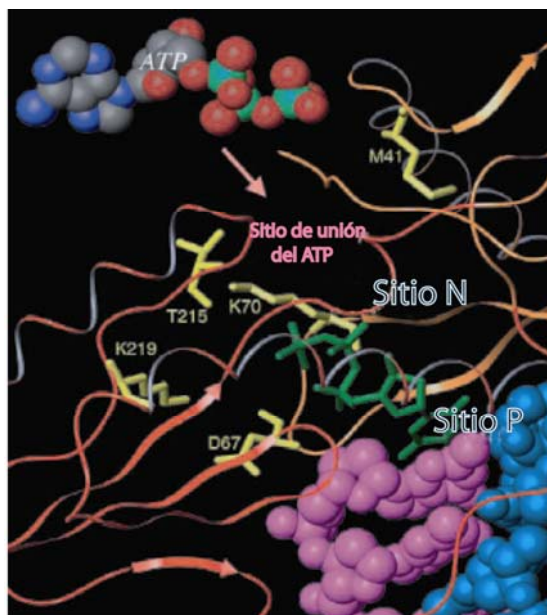
para obtener niveles altos de actividad fosforolítica dependiente de ATP (Meyer *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2000; Naeger *et al.*, 2001). Además, el doble mutante M41L/T215Y también mostró niveles significativos de actividad fosforolítica dependiente de ATP, con iniciadores bloqueados con ddA (Meyer *et al.*, 2002). La especificidad de la reacción de escisión del AZTMP se debe principalmente a la naturaleza del análogo a nucleósido y no a las TAMs (Boyer *et al.*, 2001).

Se ha propuesto un modelo para explicar el mecanismo y especificidad de la reacción de escisión en RTs resistentes al AZT, en donde se sugiere que varias TAMs (por ejemplo M41L, L210W y T215Y/F) estarían facilitando la unión del ATP (Boyer *et al.*, 2001). Según este modelo, las interacciones generadas entre el anillo de purina del ATP y la cadena lateral en la posición 215 de la RT estarían jugando un papel importante en la reacción de escisión (Boyer *et al.*, 2001; Sarafianos *et al.*, 2002). Las TAMs estarían implicadas en la colocación correcta del ATP para el ataque nucleofílico del nucleótido terminador de cadena, a través del residuo 215 y posiblemente a través de los residuos 67 y 70 (**Figura 10**). Recientemente se ha determinado la estructura cristalográfica de la RT WT y de una RT portadora de varias TAMs y resistente a AZT, unidas a un complejo molde-iniciador y a AZTp<sub>4</sub>A [3'-azido-3'-desoxitimidina-(5')-tetrafosfo-(5')-adenosina] (el producto de la escisión de AZT mediada por ATP) (Tu *et al.*, 2010). El estudio demostró que las TAMs actuarían estabilizando la posición del ATP, mediante la generación de un nuevo sitio de unión (Tu *et al.*, 2010).

El producto de la pirofosforólisis dependiente de PPi es el AZTTP mientras que en la eliminación del AZTMP mediada por ATP, lo que se libera es un compuesto tetrafosfato denominado AZTp<sub>4</sub>A. Ambos productos pueden ser reincorporados por la RT eficazmente (Dharmasena *et al.*, 2007). Además, tanto la concentración fisiológica de PPi (50 – 150 µM) como de ATP (3 mM) podrían sustentar la hipótesis de que ambos donadores de pirofosfato sean sustratos de la reacción de escisión *in vivo*. Sin embargo, la aparición de TAMs que, específicamente modifican las interacciones con la molécula de ATP ha llevado a pensar que lo más probable es que sea el ATP el sustrato natural de la reacción de escisión.

Los análisis de secuencias de RTs de aislados virales de pacientes tratados con análogos a timidina han revelado que hay dos vías diferentes para la aparición de TAMs en el VIH-1. La primera, denominada TAM1, incluye las mutaciones M41L, L210W y T215Y. La segunda, TAM2, incluye las mutaciones D67N, K70R, T215F y K219Q/E (Yahi *et al.*, 1999, 2000; Gonzales *et al.*, 2003; Flandre *et al.*, 2004; Marcelin *et al.*, 2004; Miller

*et al.*, 2004; Cozzi-Lepri *et al.*, 2005; De Luca *et al.*, 2006). Las TAM1 suelen causar mayores niveles de resistencia fenotípica y clínica a NRTIs que las TAM2, lo que se ha demostrado para ddI, AZT, abacavir y tenofovir (Miller *et al.*, 2004; Cozzi-Lepri *et al.*, 2005; Marcelin *et al.*, 2006; Parikh *et al.*, 2006; Antinori *et al.*, 2007; De Luca *et al.*, 2007). De acuerdo con su papel en la escisión mediada por ATP, la mutación T215Y suele ser la primera TAM en aparecer. Sin embargo, se desconocen los factores que llevan a la selección de TAMs1 o TAMs2.



**Figura 10. Sitio de unión teórico del ATP y localización de residuos implicados en resistencia a análogos a timidina.** Los sitios N y P representan diferentes posiciones del sitio de unión del dNTP antes y después de la translocación, respectivamente. Después de la incorporación del dNTP o del NRTI (AZT por ejemplo) a la cadena del iniciador de DNA naciente en el sitio N, la RT se transloca para que la molécula incorporada pase a estar en el sitio P. El sitio N se queda libre para el siguiente dNTP. Los residuos asociados a resistencia a TAMs (en amarillo) (Met41, Asp67, Lys70, Thr215 y Lys219) rodearían al sitio de unión del ATP. La hebra del iniciador se representa en rosa y el molde en azul. Figura adaptada de Yin *et al.*, 2006.

### ii) Mutaciones de resistencia a foscarnet

El foscarnet (ácido fosfonofórmico) inhibe una amplia variedad de DNA y RNA polimerasas incluyendo la RT del VIH-1 (Sandstrom *et al.*, 1985; Sarin *et al.*, 1985) y se utiliza como inhibidor de la replicación de citomegalovirus (revisado en De Clercq, 2004). Aunque la utilidad clínica del fármaco se ha visto limitada en el tratamiento del VIH-1, debido a sus efectos tóxicos y a su baja biodisponibilidad, el foscarnet se ha utilizado en el pasado en pacientes infectados con variantes del VIH-1 multirresistentes cuando no había mejores opciones de tratamiento (Mathiesen *et al.*, 2004).

Los efectos beneficiosos del uso de foscarnet se han visto asociados principalmente con su perfil de resistencia. Con pocas excepciones, mutaciones que

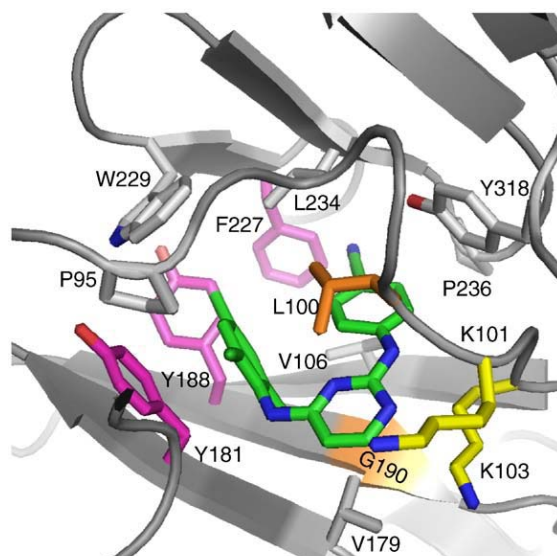
confieren una baja susceptibilidad a NRTIs y NNRTIs no afectan a la susceptibilidad del foscarnet (Mellors *et al.*, 1995; Tachedjian *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 2003b). Mediante estudios *in vitro* se han seleccionado cepas del VIH-1 resistentes al foscarnet con las mutaciones W88G/S, E89G/K, L92I, S156A, Q161L y H298Y (Mellors *et al.*, 1995). Ensayos fenotípicos con el foscarnet revelaron una disminución en la susceptibilidad al fármaco en presencia de algunas de estas mutaciones (por ejemplo, E89G, E89K, W88G, L92I, F160Y/L214F y Q161L) (Mellors *et al.*, 1995; Tachedjian *et al.*, 1995, 1996, 1998). Por otro lado, estudios bioquímicos han mostrado que varias mutaciones que confieren resistencia a foscarnet aumentan la susceptibilidad viral hacia el AZT (por ejemplo, K65R, W88G, E89K, L92I, A114S, S117T, S156A, F160Y, Q161L y M164V), particularmente en presencia de TAMs como D67N, K70R, T215Y y K219Q (Tachedjian *et al.*, 1996; Arion *et al.*, 2000; Bazmi *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2003b; Marchand *et al.*, 2007). Esto se debe posiblemente a una reducción de la escisión mediada por ATP. Por ejemplo, las mutaciones K65R, W88G, E89K, S117T y Q161L redujeron en más de tres veces la actividad de escisión mediada por ATP en iniciadores bloqueados con AZT o ddA (Meyer *et al.*, 2003b).

### 1.3.2 NNRTIs

Actualmente son cuatro los NNRTIs aprobados para su uso clínico: nevirapina, delavirdina, efavirenz y etravirina (**Figura 6B**). Se cree que estos inhibidores no evitan la unión del molde-iniciador o del dNTP a la RT, sino que actúan alterando la orientación del complejo molde-iniciador con respecto al sitio catalítico, de tal manera que el dNTP entrante no pueda ser incorporado (Tantillo *et al.*, 1994; Esnouf *et al.*, 1995; Spence *et al.*, 1995; revisado en de Béthune, 2010).

Los NNRTIs se unen a un bolsillo hidrofóbico ubicado entre los subdominios “thumb” y “palm”, a unos 8-10 Å del centro activo de la RT. El bolsillo de unión de los NNRTIs está constituido por los residuos Leu100, Lys101, Lys103, Val106, Thr107, Val108, Val179, Tyr181, Tyr188, Val189, Gly190, Phe227, Trp229, Leu234 y Tyr318 de la subunidad p66 y Glu138 de la subunidad p51 (**Figura 11**). Actúan de forma no competitiva y la interacción de estos compuestos con la RT induce cambios conformacionales que afectan a la actividad catalítica de la enzima (Sluis-Cremer *et al.*, 2004). A diferencia de los NRTIs, los NNRTIs no necesitan activación metabólica intracelular para inhibir la replicación viral y son inhibidores altamente específicos del VIH-1, de manera que no actúan sobre las RTs de otros retrovirus (Balzarini y De Clercq, 1996). Esta especificidad genera altos índices de selectividad para esta clase de compuestos (revisado en Balzarini, 2004).





**Figura 11. Representación del bolsillo de unión de los NNRTIs.** Se muestran los residuos donde aparecen las mutaciones principales de resistencia a NNRTIs. Figura tomada de Sarafianos *et al.*, 2009.

### 1.3.2.1 Resistencia a NNRTIs

La selección de mutaciones de resistencia asociadas a NNRTIs ocurre frecuentemente y su acumulación no reduce la infectividad del virus (revisado en Martínez-Picado y Martínez, 2008). El mecanismo por el que se produce resistencia a estos compuestos implica la pérdida de las interacciones hidrofóbicas y/o electrostáticas que se establecen entre el compuesto y las cadenas laterales de los residuos de la RT en su sitio de unión, desestabilizando así la unión del inhibidor a la enzima (Spence *et al.*, 1996, Das *et al.*, 1996 y revisado en Balzarini, 2004). La **Figura 12** presenta una lista de mutaciones asociadas con resistencia a NNRTIs. La mayoría de las mutaciones relacionadas con resistencia a estos inhibidores están ubicadas en el bolsillo de unión de los NNRTIs y afectan a los residuos situados en las posiciones 98-108, 179-190 y 225-236 de p66, o a la Glu138 de p51 (revisado en: Menéndez-Arias, 2002b; Balzarini, 2004; De Clercq, 2004; de Béthune, 2010) (**Figura 11**). Las sustituciones más frecuentes en los virus de pacientes que no han respondido favorablemente al tratamiento con NNRTIs son K103N y Y181C (Cheung *et al.*, 2004; Tambuyzer *et al.*, 2009). En total, se han identificado más de 40 mutaciones asociadas con resistencia a NNRTIs *in vitro* e *in vivo* (Ceccherini-Silberstein *et al.*, 2007; Tambuyzer *et al.*, 2009).



|             |     |     |     |     |     |       |       |     |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-----|
|             | L   | K   | V   | V   | Y   | Y     | G     |     |
| Nevirapina  | 100 | 103 | 106 | 108 | 181 | 188   | 190   |     |
|             | I   | N   | A/M | I   | C/I | C/L/H | A     |     |
|             |     | K   | V   |     | Y   | Y     |       | P   |
| Delavirdina | 103 | 106 |     |     | 181 | 188   |       | 236 |
|             |     | N   | M   |     | C/I | L     |       | L   |
|             | L   | K   | V   | V   | Y   | Y     | G     | P   |
| Efavirenz   | 100 | 103 | 106 | 108 | 181 | 188   | 190   | 225 |
|             | I   | N   | M   | I   | C/I | L     | S/A   | H   |
|             | V   | A   | L   | K   | V   | E     | Y     | G   |
| Etravirina  | 90  | 98  | 100 | 101 | 106 | 138   | 181   | 190 |
|             | I   | G   | I   | E/P | M   | A     | C/I/V | S/A |
|             |     |     |     |     |     |       |       | M   |
|             |     |     |     |     |     |       |       | 230 |
|             |     |     |     |     |     |       |       | L   |

Figura 12. Mutaciones en la RT asociadas a resistencia a NNRTIs. Figura adaptada de Johnson *et al.*, 2009.

A partir de estudios de cristalografía, modelado molecular y análisis computacionales con RTs que contenían mutaciones de resistencia a NNRTIs, se ha observado que, en muchos casos, hay una base estructural para el mecanismo de resistencia a NNRTIs (revisado en Ren y Stammers, 2008). En el caso de la mutación K103N, que confiere multiresistencia a los NNRTIs de primera generación (efavirenz, nevirapina y delavirdina), se han propuesto varios modelos para explicar su mecanismo de resistencia. Uno de ellos implica la formación de un enlace de hidrógeno entre la cadena lateral de Asn103 y la cadena lateral de Tyr188, que evitaría la interacción de los inhibidores con la RT mutante (Hsiou *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2007). Sin embargo, los ensayos cinéticos realizados con NNRTIs y RTs mutantes han puesto en duda esta hipótesis (Geitmann *et al.*, 2006).

Estudios recientes han demostrado la implicación de otras mutaciones ubicadas fuera del bolsillo de unión de los NNRTIs, en pacientes tratados con NRTIs. Estas mutaciones se encuentran en el subdominio “connection” de la subunidad p66, entre el subdominio “thumb” y el dominio RNasa H (Nikolenko *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2008; Waters *et al.*, 2009). Por ejemplo, las mutaciones N348I y A376S en el subdominio “connection” y Q509L en el dominio RNasa H, se han asociado con resistencia a nevirapina (Yap *et al.*, 2007; Hachiya *et al.*, 2009).

Algunos inhibidores potentes como efavirenz y en menor grado nevirapina, son capaces de incrementar las interacciones entre las subunidades p66 y p51 de la RT del VIH-1, estabilizando así su estructura heterodimérica (Tachedjian *et al.*, 2001; Tachedjian y Goff, 2003). Este efecto no parece jugar un papel fundamental en la inhibición de la RT por los NNRTIs (Xia *et al.*, 2007). Sin embargo, *in vitro* se ha observado que el efavirenz incrementa la cinética del procesamiento de Gag-Pol utilizando una poliproteína modelo, lo que sugiere que el efavirenz potencia la activación de la PR del VIH-1, promoviendo las interacciones proteína-proteína (Pol/Pol), o alterando la conformación de la poliproteína.

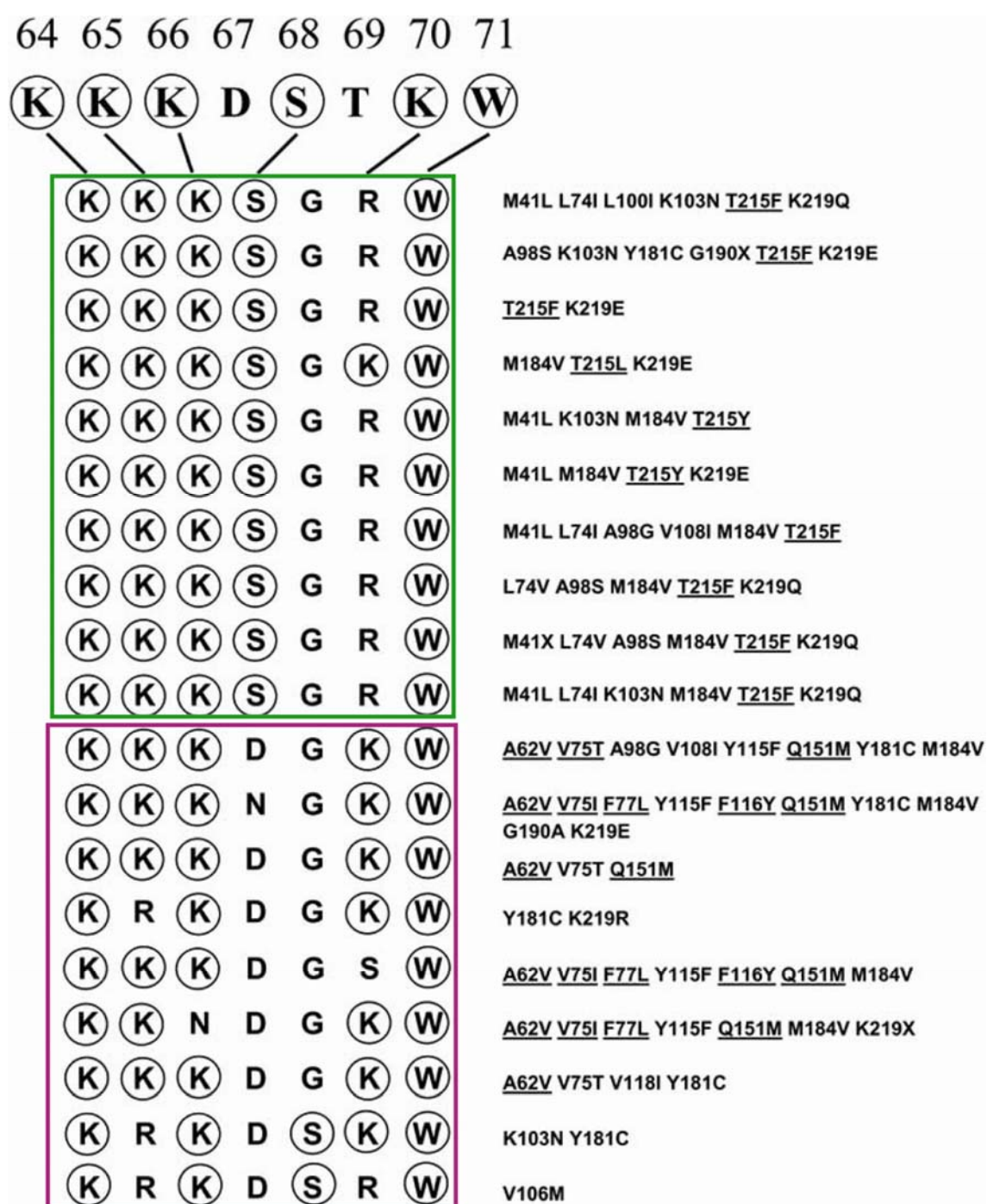
Esto facilita que la PR del VIH-1 acceda a los sitios de corte en Pol, y por tanto, su propio procesamiento (Tachedjian *et al.*, 2005).

Las modificaciones subsecuentes de los NNRTIs han ido generando nuevos fármacos, como por ejemplo la etravirina, que son más activos frente a variantes resistentes del virus (Ludovici *et al.*, 2001a,b,c; De Corte, 2005). Actualmente se siguen evaluando diferentes NNRTIs como la rilpivirina (TMC278) y la dapivirina (TMC120) (Pelemans *et al.*, 2000; Gewurz *et al.*, 2004; Fletcher *et al.*, 2009; revisado en Jochmans, 2008; Zhan *et al.*, 2009a,b).

### **1.3.3 Patrones mutacionales de multirresistencia en la RT del VIH-1: Inserciones y deleciones**

El uso extensivo de NRTIs en los tratamientos antirretrovirales ha facilitado la aparición de variantes del VIH con inserciones y deleciones en el subdominio “fingers” de la RT (revisado en Winters y Merigan, 2005; Menéndez-Arias *et al.*, 2006; Eggink *et al.*, 2007). Estas inserciones y deleciones aparecen en pacientes tratados con gran variedad de fármacos y que fracasan a las terapias existentes. Normalmente aparecen acompañadas de otros muchos cambios relacionados con resistencia a NRTIs y NNRTIs. Las inserciones más comunes son las de dos aminoácidos entre las posiciones 69 y 70 de la RT (normalmente Ser-Ser, Ser-Ala y Ser-Gly) y que suelen ir acompañadas del cambio T69S. Se ha demostrado que la inserción es clave para la adquisición, por parte de la RT, de una actividad fosforolítica dependiente de ATP, lo que le permite eliminar el AZTMP de iniciadores bloqueados por el fármaco en su extremo 3' (Mas *et al.*, 2000). Estudios posteriores confirmaron estos resultados y revelaron que la inserción también presentaba un efecto relevante en la escisión de iniciadores terminados con d4TMP, ddTMP, ddAMP y tenofovir (Mas *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2003a; White *et al.*, 2004).

La prevalencia de las inserciones en la horquilla  $\beta 3\text{-}\beta 4$  ha sido estimada entre el 0,5-2,7% (Winters *et al.*, 1998; Sugiura *et al.*, 1999; Yahi *et al.*, 1999; Van Vaerenbergh *et al.*, 2000; Briones *et al.*, 2001). En un estudio de 2.152 secuencias de pacientes infectados con VIH-1 y tratados con NRTIs se encontraron sólo 4 secuencias con deleciones (prevalencia estimada del 0,2%) (Masquelier *et al.*, 2001). En los 4 casos, la deleción del codón 67 ( $\Delta 67$ ) se asociaba con la mutación T69G y con la presencia de 0 a 3 TAMs. En 3 de los 4 casos observados, la mutación M184V también estaba presente. Ensayos fenotípicos mostraron niveles altos de resistencia al 3TC cuando M184V estaba



**Figura 13. Secuencias de aminoácidos en las posiciones 64-71 de RTs del VIH-1 con deleciones de un aminoácido encontradas en aislados clínicos.** La secuencia WT se muestra en la parte superior de la figura con los residuos de aminoácidos conservados rodeados de un círculo. Las mutaciones de resistencia acompañantes en cada caso se muestran a la derecha. Las primeras 10 secuencias (cuadro verde) son portadoras de la deleción Δ67 mientras que las últimas 9 (cuadro rosa) son portadoras de la deleción Δ69. Las secuencias originales se obtuvieron de las siguientes referencias: Winters *et al.*, 2000; Masquelier *et al.*, 2001; Beerenwinkel *et al.*, 2002; Gonzales *et al.*, 2003; Rhee *et al.*, 2004 y Weber *et al.*, 2005. Figura adaptada de Menéndez-Arias *et al.*, 2006.

presente, y al AZT en el clon que llevaba las 3 TAMs (L210W, T215F y K219E) (Masquelier *et al.*, 2001). Otros patrones mutaciones encontrados en aislados clínicos que confieren resistencia fenotípica al AZT contienen la delección  $\Delta 67$  y el cambio T69G en combinación con las TAMs K70R, T215F y K219E (Ross *et al.*, 2000) (**Figura 13**).

La RT del VIH-1 recombinante que contiene el complejo de mutaciones de la delección  $\Delta 67$  (M41L/ $\Delta 67$ /T69G/K70R/L74I/K103N/T215Y/K219Q) tiene una elevada capacidad de escisión en iniciadores bloqueados con AZT, d4T y tenofovir, especialmente en presencia de PPI (Boyer *et al.*, 2004). Sin embargo, la contribución de la delección  $\Delta 67$  en los mecanismos de escisión y discriminación de nucleótido para la adquisición de resistencia no ha sido estudiada. Se ha observado que la delección por sí sola, confiere niveles bajos de resistencia fenotípica a 3TC, ddC, d4T y abacavir (Imamichi *et al.*, 2000b; Ross *et al.*, 2000; Winters *et al.*, 2000; Imamichi *et al.*, 2001).

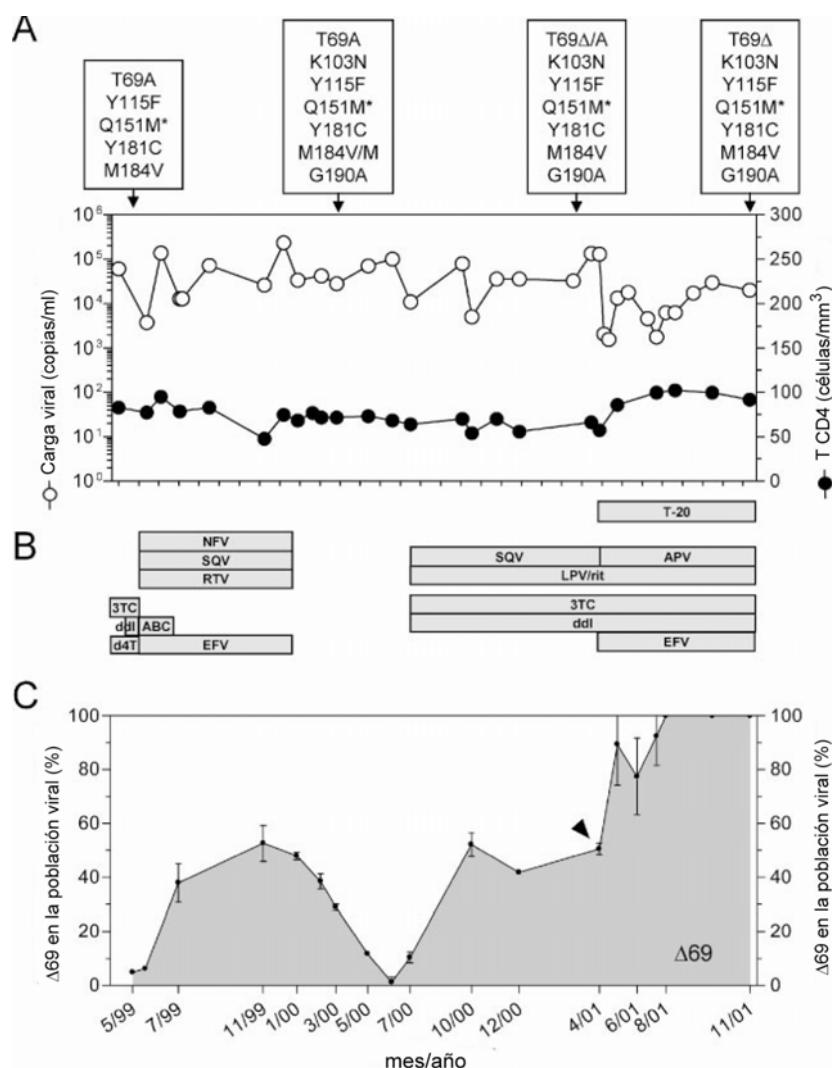
Además, se ha descrito otra delección de un aminoácido que afecta al codón 69 ( $\Delta 69$ ) en la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  de la RT. En algunos aislados virales, esta delección aparece junto con una o más mutaciones del complejo de la Q151M, además del cambio M184V (Winters *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Winters y Merigan., 2001; Villena *et al.*, 2007; Wallis *et al.*, 2010) (**Figura 13**). Por lo general, estos virus suelen ser resistentes a varios análogos a nucleósidos, ya que contienen múltiples mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales (Winters *et al.*, 2000; Villena *et al.*, 2007).

Los procesos evolutivos que llevan a la selección de delecciones entre los codones 67-70 aún no se conocen, y se necesitan más estudios para identificar los contextos de secuencia que favorecen la aparición de delecciones.

### **1.3.4 Antecedentes específicos del trabajo: Estudio de un aislado clínico multirresistente del VIH-1 portador de una delección en la posición 69 de la RT (Villena *et al.*, 2007)**

En la unidad de VIH del Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona) se identificó un paciente infectado durante 12 años con un virus multirresistente portador de la delección  $\Delta 69$  y mutaciones de resistencia asociadas al complejo de la Q151M en la RT, que además no poseía TAMs. Se disponía del seguimiento clínico del paciente a lo largo del tratamiento antirretroviral desde mayo 1999 a noviembre de 2001 (**Figura 14**). A pesar de utilizar distintos regímenes terapéuticos que contenían hasta seis fármacos antirretrovirales (**Figura 14B**), las cargas virales en el plasma del paciente fluctuaron entre  $10^3$  y  $2 \times 10^5$  copias de RNA/ml y los recuentos de células T-CD4<sup>+</sup> nunca sobrepasaron las 120 células/ $\mu$ l (**Figura 14A**). La interrupción del tratamiento durante 6

meses, debida al tratamiento de una hepatitis C con interferón a principios del año 2000, no cambió el curso clínico de la infección por el VIH-1. Un análisis genotípico de la población de RNA viral obtenida a distintos intervalos de tiempo reveló la presencia de al menos 9 sustituciones de aminoácidos asociadas con resistencia a NRTIs y NNRTIs en la región codificante de la RT, incluyendo entre ellas una delección de tres nucleótidos en la posición 69 ( $\Delta 69$ ) (Villena *et al.*, 2007) (Figura 14A).



**Figura 14. Evolución clínica del paciente.** (A) Determinación de la carga viral en plasma y recuentos de linfocitos T CD4 a lo largo del período del estudio. Los cuadros superiores muestran las mutaciones asociadas a resistencia a inhibidores de la RT. En todos los casos, la sustitución Q151M estuvo acompañada de A62V, V75I, F77L y F116Y (indicado como Q151M\*). La delección  $\Delta 69$  se encontró siempre acompañada del cambio S163I. La sustitución Y181C fue probablemente seleccionada previamente durante un régimen que incluía nevirapina. (B) Terapia antirretroviral utilizada durante el seguimiento del paciente en el estudio. La abreviaturas de los fármacos: 3TC, lamivudina; ddI, didanosina; d4T, estavudina; ABC, abacavir; EFV, efavirenz; NFV, nevirapina; SQV, saquinavir; RTV, ritonavir; APV, amprenavir; LPV/rit, lopinavir con dosis mínimas de ritonavir; T-20, enfuvirtide. (C) Selección *in vivo* de  $\Delta 69$ . La flecha indica el aislado clínico utilizado para la obtención de los clones virales del VIH-1 representativos que se utilizaron en la construcción de virus recombinantes derivados del paciente. Figura adaptada de Villena *et al.*, 2007.

En la **Figura 14C** podemos observar que a mediados del año 1999 se comienza a detectar la presencia de la delección  $\Delta 69$ , durante el tratamiento con 3TC, ddI y d4T. Al cabo de dos meses de tratamiento con abacavir y efavirenz, se observó que el porcentaje de  $\Delta 69$  en la población viral incrementaba del 5 al 50%. La interrupción posterior del tratamiento dio lugar a un descenso importante de la población viral que contenía  $\Delta 69$ , aunque sin cambios en la carga viral, lo que sugería que la delección  $\Delta 69$  no se seleccionaba en ausencia de presión farmacológica. El reinicio de la terapia con fármacos entre los que se incluyeron 3TC y ddI, ocasionó un nuevo aumento de la población viral portadora de la delección, alcanzando el 50% del total. La intensificación del tratamiento con efavirenz y enfuvirtide hizo dominante a la delección. Se observó también que, precediendo a la aparición de la delección  $\Delta 69$ , se generaba el cambio de una Thr por Ala en la posición 69 y que la delección siempre aparecía acompañada por la mutación S163I.

En el estudio de Villena *et al.* (2007), se generaron 7 clones viables del VIH-1: tres de ellos llevaban los residuos 15 a 248 de la RT del aislado clínico bajo un contexto de secuencia WT (NL4-3), dos llevaban los residuos 15 a 527 de la RT del paciente y otros dos llevan una RT WT (NL4-3) y se diferencian entre ellos en la posición 69. La **Figura 15** muestra las sustituciones de aminoácidos dentro de la RT de los clones virales obtenidos.

| Virus                                  | Dominio DNA polimerasa |    |    |    |          |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Subdominio "connection" |     |     |     |     |     |     | Dominio RNasa H |     |     |     |     |     |     |     |   |   |
|--|------------------------|----|----|----|----------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|
|  | 20                     | 39 | 62 | 68 | 69       | 70 | 75 | 77 | 101 | 102 | 103 | 115 | 116 | 123 | 135 | 151 | 162 | 163 | 167 | 177 | 181 | 184 | 190 | 202 | 211                     | 294 | 297 | 331 | 357 | 358 | 375 | 386             | 449 | 460 | 468 | 491 | 512 | 517 | 519 |   |   |
| HIV-1 <sub>NL4-3</sub>                 | K                      | T  | A  | S  | T        | K  | V  | F  | K   | Q   | K   | Y   | F   | D   | I   | Q   | C   | S   | I   | D   | Y   | M   | G   | I   | R                       | P   | E   | K   | M   | K   | I   | T               | E   | D   | P   | L   | K   | L   | S   |   |   |
| HIV-1 <sub>NL4-3</sub> (T69A)          | -                      | -  | -  | -  | A        | -  | -  | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -                       | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - |   |
| HIV-1 <sub>NL4-3</sub> ( $\Delta 69$ ) | -                      | -  | -  | -  | $\Delta$ | -  | -  | -  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -                       | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - |   |
| MDRc3 (T69A)                           | R                      | A  | V  | G  | A        | G  | I  | L  | R   | K   | N   | F   | Y   | E   | T   | M   | S   | -   | V   | E   | C   | V   | A   | V   | K                       | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - |   |
| MDRc7 ( $\Delta 69$ /S163I)            | -                      | A  | V  | G  | $\Delta$ | G  | I  | L  | R   | K   | N   | F   | Y   | E   | T   | M   | S   | I   | V   | E   | C   | V   | A   | V   | K                       | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - | - |
| MDRc7b ( $\Delta 69$ )                 | -                      | A  | V  | G  | $\Delta$ | G  | I  | L  | R   | K   | N   | F   | Y   | E   | T   | M   | S   | -   | V   | E   | C   | V   | A   | V   | K                       | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | - | - |
| MDRc3* (T69A)                          | R                      | A  | V  | G  | A        | G  | I  | L  | R   | K   | N   | F   | Y   | E   | T   | M   | S   | -   | V   | E   | C   | V   | A   | V   | K                       | T   | K   | -   | T   | R   | V   | I               | D   | N   | S   | S   | T   | I   | N   |   |   |
| MDRc7* ( $\Delta 69$ /S163I)           | -                      | A  | V  | G  | $\Delta$ | G  | I  | L  | R   | K   | N   | F   | Y   | E   | T   | M   | S   | I   | V   | E   | C   | V   | A   | V   | K                       | T   | K   | R   | T   | R   | V   | I               | D   | N   | S   | S   | T   | I   | N   |   |   |

**Figura 15. Sustituciones de aminoácidos dentro de la RT de los clones recombinantes utilizados en el estudio virológico.** Diferencias de aminoácidos en las RTs de los clones virales obtenidos del plasma del paciente en abril del 2001. Las mutaciones asociadas con resistencia a NRTIs y NNRTIs se muestran en rojo y verde, respectivamente. Figura adaptada de Villena *et al.*, 2007.

A diferencia de lo observado *in vivo*, los ensayos *in vitro* demostraron que las variantes del VIH-1 portadoras de la delección  $\Delta 69$  tenían una mayor capacidad replicativa con respecto al virus WT (NL4-3), en ausencia de presión farmacológica. Solamente en presencia de determinadas mutaciones ubicadas en el subdominio "connection" y en el dominio RNasa H de la RT (**Figura 15**, clon viral MDRc7\*), el clon portador de la delección  $\Delta 69$  mostró una menor capacidad replicativa (*in vitro*), lo que sugirió una interacción funcional entre los residuos de la región C-terminal de la RT y el dominio DNA polimerasa.

Los estudios realizados en presencia de fármacos antirretrovirales mostraron un incremento de la capacidad replicativa de las variantes del VIH-1 que llevaban la RT del paciente (aminoácidos 15-248) portadora de la delección  $\Delta 69$  y S163I, con respecto al virus de referencia WT (NL4-3) (Villena *et al.*, 2007). La reversión del cambio de Ile a Ser en la posición 163 disminuyó la eficiencia replicativa de la variante portadora de la delección  $\Delta 69$  respecto a la RT WT, sugiriendo que la aparición de la mutación S163I contribuye al incremento del “fitness” del virus portador de la delección (Villena *et al.*, 2007).

Los virus recombinantes tomados del plasma del paciente infectado fueron muy resistentes a todos los inhibidores de la RT (Villena *et al.*, 2007). El único fármaco que retuvo alguna actividad frente a los clones virales portadores de la delección  $\Delta 69$  fue el tenofovir (**Figura 16**). Por otro lado, se observó que la delección por sí sola [en un contexto de secuencia WT (NL4-3)] confiere hipersensibilidad a AZT y bajos niveles de resistencia a 3TC (Villena *et al.*, 2007). El virus mutante portador de la delección  $\Delta 69$  fue muy sensible a todos los demás fármacos analizados, sugiriendo que las mutaciones acompañantes presentes en el virus del paciente contribuyen de forma significativa a la resistencia (**Figura 16**).

| Virus                           | Incremento en la $CI_{50}$ con respecto a la del virus control |       |      |      |       |      |       |        |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      | RC (% relativo al valor de $HIV_{NL4-3}$ ) |
|---------------------------------|--|-------|------|------|-------|------|-------|--------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
|                                 | NRTI   |       |      |      |       |      |       |        | NNRTI |      |      | PI   |      |      |      |      |      |      |  |
|                                 | ABC  | ddI   | FTC  | 3TC  | d4T   | TFV  | ddC   | ZDV    | DLV   | EFV  | NVP  | ATV  | APV  | IDV  | LPV  | NFV  | RTV  | SQV  |  |
| $HIV-1_{NL4-3}$                 | 0.87   | 1.02  | 0.80 | 0.88 | 0.97  | 0.93 | 0.96  | 0.93   | 1.04  | 0.79 | 1.07 | 0.89 | 0.88 | 0.97 | 0.89 | 0.86 | 0.85 | 0.93 | 95   |
| $HIV-1_{NL4-3}$ (T69A)          | 1.00   | 1.09  | 1.15 | 1.14 | 1.14  | 0.81 | 1.13  | 0.73   | 0.79  | 0.66 | 0.79 | 0.86 | 1.01 | 0.86 | 0.94 | 0.86 | 0.93 | 0.75 | 84   |
| $HIV-1_{NL4-3}$ ( $\Delta 69$ ) | 1.25   | 1.02  | 5.30 | 3.51 | 1.00  | 0.67 | 1.34  | 0.19   | 0.61  | 0.54 | 0.54 | 0.86 | 0.90 | 0.90 | 0.92 | 0.96 | 0.88 | 0.86 | 73   |
| MDRc3 (T69A)                    | >>>  | 10.88 | >>>  | >>>  | 8.75  | 1.79 | 20.39 | 392.36 | >>>   | >>>  | >>>  | 0.32 | 0.34 | 0.35 | 0.34 | 0.36 | 0.31 | 0.32 | 10   |
| MDRc7 ( $\Delta 69$ /S163I)     | >>>  | 12.03 | >>>  | >>>  | 8.56  | 1.60 | 26.27 | 570.91 | >>>   | >>>  | >>>  | 0.64 | 0.72 | 0.72 | 0.69 | 0.73 | 0.70 | 0.65 | 45   |
| MDRc7b ( $\Delta 69$ )          | >>>  | 19.35 | >>>  | >>>  | 13.68 | 2.03 | 32.89 | 686.60 | >>>   | >>>  | >>>  | 0.49 | 0.55 | 0.48 | 0.45 | 0.50 | 0.44 | 0.49 | 33   |

**Figura 16. Capacidad replicativa *in vitro* y susceptibilidad viral a fármacos antirretrovirales de distintos clones del VIH-1 recombinantes.** Se indica el aumento de la  $CI_{50}$  para el inhibidor con respecto al virus control  $HIV-1_{NL4-3}$  (en  $n^\circ$  de veces). Cuando los aumentos son suficientemente elevados con respecto al valor umbral de cada fármaco se indican en negrita. La RC (capacidad replicativa) se determinó utilizando una modificación del ensayo PhenoSense (Monogram, San Francisco). Las abreviaturas utilizadas son: >>>, niveles altos de resistencia, por encima del valor máximo de detección del ensayo; NRTI, inhibidor análogo a nucleósido; NNRTI, inhibidor no análogo a nucleósido; PI inhibidor de la proteasa; ABC, abacavir; ddI, didanosina; FTC, emtricitabina; 3TC, lamivudina; d4T, estavudina; TFV, tenofovir; ddC, zalcitabina; ZDV, zidovudina; DLV, delavirdina; EFV, efavirenz; NVP, nevirapina; ATV, atazanavir; APV, amprenavir; IDV, indinavir; LPV, lopinavir; NFV, nelfinavir; RTV, ritonavir; SQV, saquinavir. Figura adaptada de Villena *et al.*, 2007.





## **2.OBJETIVOS**



Los objetivos que nos hemos planteado en esta Tesis Doctoral han sido:

1. Analizar la ventaja selectiva de la introducción en la RT del VIH-1 de la delección  $\Delta 69$  en un contexto de secuencia multirresistente y determinar el papel de la delección y sus mutaciones acompañantes en el mecanismo de resistencia a inhibidores de la RT.
2. Estudiar el papel que juega la mutación del subdominio “connection” A376S sobre la resistencia a nevirapina y otros NNRTIs.
3. Determinar el mecanismo molecular a través del cual la delección  $\Delta 69$  confiere hipersensibilidad al AZT y resistencia a 3TC, cuando se introduce en un contexto de secuencia WT.
4. Determinar si la delección  $\Delta 69$  produce efectos antagonistas sobre resistencia a AZT y foscarnet.
5. Estudiar el papel de mutaciones asociadas a deleciones en la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  de la RT del VIH-1 en la resistencia a NRTIs y determinar los mecanismos moleculares por los que variantes de la RT portadoras de  $\Delta 67$  o  $\Delta 69$  modulan la sensibilidad a inhibidores de la RT.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1 Amplificación y clonación de las RTs

A lo largo de este trabajo se han utilizado RTs recombinantes que se obtuvieron mediante expresión y purificación en *E. coli*, para lo que empleamos vectores obtenidos de estudios anteriores en los que se insertaron las secuencias codificantes de las RTs WT (NL4-3), T69A,  $\Delta$ 69, MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_ $\Delta$ 69, MDR\_ $\Delta$ 69/S163I, K103N y A376S (Villena et al., 2007; Puertas *et al.*, 2010) (**Figura 17**). Las RTs que llevan el prefijo MDR (“multi-drug resistant”) contienen la secuencia del dominio DNA polimerasa (residuos 15 a 248) perteneciente a una RT de un aislado viral obtenido de un paciente que fracasó al tratamiento antirretroviral (Villena *et al.*, 2007).

Las secuencias codificantes de las RTs WT (NL4-3), T69A,  $\Delta$ 69, K103N y A376S se amplificaron por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con los oligonucleótidos 5'-GCACTTTGAATTCTCCATTAGTCCTATTGAGAC-3' (NEC) y 5'-CCATCTAACTCGAGTACTTTCCTGATTCC-3' (CXH) mientras que las RTs MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_ $\Delta$ 69 y MDR\_ $\Delta$ 69/S163I se amplificaron con los oligonucleótidos 5'-GCACTTTCAATTGTCCATTAGTCCTATTGAGAC-3' (NMF) y CXH (**Figura 17**).

La amplificación por PCR se llevó a cabo en 50  $\mu$ l de un tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,8) que contenía KCl 10 mM, (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, Triton X-100 al 0,1%, seroalbúmina bovina libre de nucleasa (BSA) 0,1 mg/ml, 200 ng de cada uno de los correspondientes oligonucleótidos mutagénicos, 1  $\mu$ g del DNA molde plásmido, dNTPs a una concentración de 50  $\mu$ M cada uno y 1,5 U de la DNA polimerasa Pfu (Promega). La amplificación se inició con una incubación de 2 min a 95 °C seguida de 20 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 55 °C y 5 min a 68 °C. El DNA purificado se cortó con las enzimas EcoRI y XhoI [amplificaciones para WT (NL4-3) y mutantes T69A,  $\Delta$ 69, K103N y A376S] o con MfeI y XhoI (mutantes MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_ $\Delta$ 69 y MDR\_ $\Delta$ 69/S163I) y los fragmentos resultantes se clonaron en el vector de expresión pRT66B (BH10), previamente digerido con EcoRI y XhoI (**Figura 18A**). La integridad de todas las construcciones se comprobó mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

## Materiales y Métodos

|                   | 39       | 41       | 62       | 67             | 68       | 69       | 70       | 75       | 77       | 101      | 102      | 103      | 115      | 116      | 123      | 135      | 151      | 162      | 163      | 167      | 177      | 181      | 184      | 190      | 202      | 211      | 215      | 219      | 376      |
|-------------------|----------|----------|----------|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>WT (NL4-3)</b> | <b>T</b> | <b>M</b> | <b>A</b> | <b>D</b>       | <b>S</b> | <b>T</b> | <b>K</b> | <b>V</b> | <b>F</b> | <b>K</b> | <b>Q</b> | <b>K</b> | <b>Y</b> | <b>F</b> | <b>D</b> | <b>I</b> | <b>Q</b> | <b>C</b> | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>D</b> | <b>Y</b> | <b>M</b> | <b>G</b> | <b>I</b> | <b>R</b> | <b>T</b> | <b>K</b> | <b>A</b> |
| <b>C_Q151M*</b>   | •        | •        | <u>V</u> | •              | •        | •        | •        | <u>I</u> | <u>L</u> | •        | •        | •        | •        | <u>Y</u> | •        | •        | <u>M</u> | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        |
| MDR_69T           | A        | •        | <u>V</u> | •              | G        | T        | G        | <u>I</u> | <u>L</u> | R        | K        | <u>N</u> | F        | <u>Y</u> | E        | T        | <u>M</u> | S        | •        | V        | E        | C        | <u>V</u> | A        | V        | K        | •        | •        | •        |
| MDR_Δ69           | A        | •        | <u>V</u> | •              | G        | Δ        | G        | <u>I</u> | <u>L</u> | R        | K        | <u>N</u> | F        | <u>Y</u> | E        | T        | <u>M</u> | S        | •        | V        | E        | C        | <u>V</u> | A        | V        | K        | •        | •        | •        |
| MDR_Δ69/S163I     | A        | •        | <u>V</u> | •              | G        | Δ        | G        | <u>I</u> | <u>L</u> | R        | K        | <u>N</u> | F        | <u>Y</u> | E        | T        | <u>M</u> | S        | I        | V        | E        | C        | <u>V</u> | A        | V        | K        | •        | •        | •        |
| MDR_T69A          | A        | •        | <u>V</u> | •              | G        | A        | G        | <u>I</u> | <u>L</u> | R        | K        | <u>N</u> | F        | <u>Y</u> | E        | T        | <u>M</u> | S        | •        | V        | E        | C        | <u>V</u> | A        | V        | K        | •        | •        | •        |
| MDR_Δ69/I75V      | A        | •        | <u>V</u> | •              | G        | Δ        | G        | •        | <u>L</u> | R        | K        | <u>N</u> | F        | <u>Y</u> | E        | T        | <u>M</u> | S        | •        | V        | E        | C        | <u>V</u> | A        | V        | K        | •        | •        | •        |
| K103N             | •        | •        | •        | •              | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | <u>N</u> | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        |
| A376S             | •        | •        | •        | •              | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | S        |
| T69A              | •        | •        | •        | •              | •        | A        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        |
| Δ69               | •        | •        | •        | •              | •        | Δ        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        |
| Δ69/K219E         | •        | •        | •        | •              | •        | Δ        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | E        | •        |
| GΔ69G             | •        | •        | •        | •              | G        | Δ        | G        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        |
| GΔ69G/K219E       | •        | •        | •        | •              | G        | Δ        | G        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | E        | •        |
| Δ67GR             | •        | •        | •        | Δ <sup>1</sup> | •        | G        | <u>R</u> | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        |
| Δ67GR/K219E       | •        | •        | •        | Δ              | •        | G        | <u>R</u> | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | E        | •        |
| <b>BH10</b>       | <b>T</b> | <b>M</b> | <b>A</b> | <b>D</b>       | <b>S</b> | <b>T</b> | <b>K</b> | <b>V</b> | <b>F</b> | <b>K</b> | <b>K</b> | <b>K</b> | <b>Y</b> | <b>F</b> | <b>D</b> | <b>I</b> | <b>Q</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>D</b> | <b>Y</b> | <b>M</b> | <b>G</b> | <b>I</b> | <b>R</b> | <b>T</b> | <b>K</b> | <b>T</b> |
| <b>M41L/T215Y</b> | •        | <u>L</u> | A        | •              | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | <u>Y</u> | •        | •        |
| GΔ69G_LY          | •        | <u>L</u> | •        | •              | G        | Δ        | G        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | <u>Y</u> | •        | •        |
| Δ67GR_LY          | •        | <u>L</u> | •        | Δ              | •        | G        | R        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | •        | <u>Y</u> | •        | •        |

**Figura 17. Diferencias entre las secuencias de las RTs WT (NL4-3 y BH10) y las RTs estudiadas en este trabajo.** Los residuos de las RTs WT (NL4-3) y BH10 se encuentran en rojo y sus diferencias se encuentran resaltadas en amarillo. Los residuos iguales a los encontrados en las enzimas WT se indican mediante puntos. Los aminoácidos subrayados, son los característicos del complejo de la Q151M de resistencia a NRTIs.

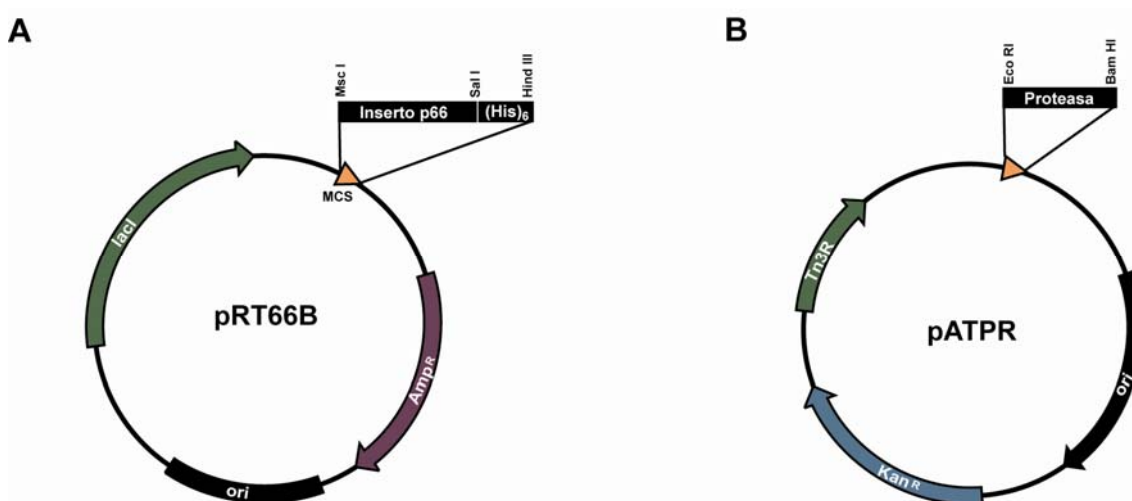
Δ<sup>1</sup> = El símbolo Δ representa una delección de tres nucleótidos que afecta al codón de la RT indicado.

\* Enzima purificada previamente en el laboratorio y disponible de estudios anteriores (Matamoros *et al.*, 2009).



### 3.2 Mutagénesis dirigida

Se han introducido diversas mutaciones en plásmidos derivados de pRT66B que contenían las regiones codificantes de las RTs WT (NL4-3),  $\Delta 69$ , MDR\_ $\Delta 69$  y M41L/T215Y. El plásmido derivado de pRT66B, portador de la RT mutante M41L/T215Y (en un contexto de secuencia BH10) se encontraba disponible de estudios anteriores en el laboratorio (Betancor *et al.*, 2010).



**Figura 18. (A) Plásmido utilizado para la mutagénesis y expresión de la subunidad p66 de la RT.** El plásmido pRT66B (Boretto *et al.*, 2001) es una construcción derivada del plásmido pTrc99A (Amersham Bioscience) en el que se introdujo la región codificante de p66 con una secuencia de 6 histidinas en su extremo 5', usando las dianas de restricción MscI y HindIII. **(B) Plásmido utilizado para la expresión de la PR.** El plásmido pATPR (Boretto *et al.*, 2001) se construyó a partir del plásmido pAT clonando el gen de la PR del VIH-1 precedida por el codón ATG y el sitio de unión de ribosomas (RBS) de T7g10, entre los sitios de restricción EcoRI y BamHI. Las bacterias se transforman con este plásmido y con el plásmido pRT66B para que se produzca el procesamiento de la p66 de la RT. La abreviatura Amp<sup>R</sup> indica la región codificante del gen de resistencia a ampicilina y Kan<sup>R</sup> indica la región codificante del gen de resistencia a kanamicina. (His)<sub>6</sub> indica la secuencia codificante para 6 histidinas.

La introducción de las mutaciones se llevó a cabo mediante el sistema de mutagénesis *in vitro* “QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit” de Stratagene. Este método se basa en la utilización de un plásmido molde, que en nuestro caso es el vector de expresión pRT66B que contiene la región codificante de una variante de la p66 de la RT (**Figura 18A**), en el que se introdujeron mutaciones utilizando los oligonucleótidos mutagénicos descritos en la **Tabla 2**.

En primer lugar, se introdujeron las mutaciones  $\Delta 67$ /T69G/K70R y I75V en plásmidos derivados de pRT66B que contenían las regiones codificantes de la subunidad p66 de las RTs WT (NL4-3) y MDR\_ $\Delta 69$ , respectivamente (**Tabla 2**). Por otro lado, las mutaciones S68G/K70G y K219E se introdujeron por separado en la RT

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en la reacción de mutagénesis

| Mutaciones                            |  | Oligonucleótidos |  |
|---------------------------------------|--|------------------|--|
| Introducidas en WT (NL4-3)            |  |                  |  |
| Δ67/T69G/K70R<br>(Δ67GR)              | 5 ' CCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAAGTGGTAGATGGAGAAAATTAGTA 3 '<br>3 ' GGTCATAAACGGTATTTCTTTTTTTTCACCATCTACCTCTTTTAATCAT 5 '              |                  |  |
| Introducidas en Δ69                   |  |                  |  |
| S68G/K70G<br>(GΔ69G)                  | 5 ' GCCATAAAGAAAAAAGACGGTGGATGGAGAAAATTAGTAG 3 '<br>3 ' CGGTATTTCTTTTTTCTGCCTCCTACCTCTTTTAATCATC 5 '                               |                  |  |
| K219E<br>(Δ69/K219E)                  | 5 ' GATTTACCACACCAGACGAAAAACATCAGAAAGAAC 3 '<br>3 ' CTAAATGGTGTGGTCTGCTTTTTGTAGTCTTTCTTG 5 '                                       |                  |  |
| Introducidas en MDR_Δ69               |  |                  |  |
| I75V<br>(MDR_Δ69/I75V)                | 5 ' GGATGGAGAAAATTA <del>G</del> TAGATCTCAGAGAAC 3 '<br>3 ' CCTACCTCTTTTAAT <del>CAT</del> CTAGAGTCTCTTG 5 '                       |                  |  |
| Introducidas en M41L/T215Y            |  |                  |  |
| S68G/Δ69/K70G<br>(GΔ69G_LY)           | 5 ' GCCATAAAGAAAAAAGACGGTGGATGGAGAAAATTAGTAG 3 '<br>3 ' CGGTATTTCTTTTTTCTGCCTCCTACCTCTTTTAATCATC 5 '                               |                  |  |
| Δ67/T69G/K70R<br>(Δ67GR_LY)           | 5 ' CCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAAGTGGTAGATGGAGAAAATTAGTA 3 '<br>3 ' GGTCATAAACGGTATTTCTTTTTTTTCA <del>CCATCT</del> ACCTCTTTTAATCAT 5 ' |                  |  |
| Mutantes derivadas de las anteriores  |  |                  |  |
| Mutaciones                            |  | Oligonucleótidos |  |
| Introducidas en S68G/Δ69/K70G (GΔ69G) |  |                  |  |
| K219E<br>(GΔ69G/K219E)                | 5 ' GATTTACCACACCAGACGAAAAACATCAGAAAGAAC 3 '<br>3 ' CTAAATGGTGTGGTCTG <del>CTTTT</del> GTAGTCTTTCTTG 5 '                           |                  |  |
| Introducidas en Δ67/T69G/K70R (Δ67GR) |  |                  |  |
| K219E<br>(Δ67GR/K219E)                | 5 ' GATTTACCACACCAGACGAAAAACATCAGAAAGAAC 3 '<br>3 ' CTAAATGGTGTGGTCTG <del>CTTTT</del> GTAGTCTTTCTTG 5 '                           |                  |  |

En la columna de la izquierda se indican en negro las mutaciones introducidas utilizando el código de una letra, de modo que se muestra el nombre del aminoácido en la secuencia de la RT, seguido de la posición y sustitución realizada. En rojo y entre paréntesis, se indica el nombre utilizado para cada mutante en este trabajo. Los nucleótidos subrayados son los correspondientes a la mutación introducida en la región de la RT y los que están en rojo son los que se han cambiado para lograr la mutación. Todas las mutaciones fueron confirmadas por secuenciación. Para la introducción de dichas mutaciones se utilizaron dos oligonucleótidos, uno para la hebra sentido (5'→3') y otro para el antisentido (3'→5'). En el caso de la mutación K219E, los oligonucleótidos utilizados fueron los mismos para los tres mutantes obtenidos (Δ69/K219E, GΔ69G/K219E y Δ67GR/K219E).

$\Delta 69$  (**Tabla 2**). De esta forma se obtuvieron las enzimas mutantes denominadas  $\Delta 67GR$ , MDR\_ $\Delta 69$ \_I75V, G $\Delta 69G$  y  $\Delta 69/K219E$ . Además, la mutación K219E se introdujo en el contexto de secuencia de las variantes  $\Delta 67GR$  y G $\Delta 69G$  tal como se describe en la **Tabla 2**, y las mutaciones S68G/ $\Delta 69/K70G$  y  $\Delta 67/T69G/K70R$ , se introdujeron en el plásmido pRT66B, que contenía la región codificante de la RT M41L/T215Y. Las enzimas mutantes portadoras de TAMs se denominaron G $\Delta 69G$ \_LY y  $\Delta 67GR$ \_LY (**Figura 17**, **Tabla 2**).

La reacción de mutagénesis se llevó a cabo en 50  $\mu$ l de un tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,8) que contenía KCl 10 mM,  $(NH_4)SO_4$  10 mM,  $MgSO_4$  2 mM, Triton X-100 al 0,1%, BSA 0,1 mg/ml, 125 ng de cada uno de los correspondientes oligonucleótidos mutagénicos, 5-50 ng de plásmido (pRT66B), dNTPs a una concentración de 500  $\mu$ M cada uno y 2,5 U de la DNA polimerasa Pfu (Promega). La amplificación se inició con una incubación de 2 min a 95 °C seguida de 18 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 55 °C y 12 min a 68 °C. El producto se trató a 37 °C durante 1 hora con 10 U de la enzima de restricción DpnI (Promega). DpnI es una endonucleasa que actúa sobre DNA metilado o hemimetilado, lo que produce la degradación de las hebras parentales de DNA que se encuentran metiladas al utilizarse plásmidos amplificados en una cepa *dam*<sup>+</sup> de *E. coli*. Así, quedan únicamente las hebras sintetizadas *de novo* durante la reacción de amplificación y que contienen la mutación deseada. Se transformó 1  $\mu$ l del producto de la reacción anterior en células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  [*F*<sup>-</sup>,  $\phi 80dlacZ\Delta M15$ ,  $\Delta(lacZYA-argF)$ , *U169*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>*), *phoA*, *supE44*,  $\lambda^-$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*] y se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina.

A continuación, se identificaron las mutaciones mediante secuenciación del DNA plasmídico extraído con el kit “Wizard Plus SV Minipreps” (Promega). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo por Macrogen (Seul, Corea del Sur) utilizando un secuenciador automático basado en fluorescencia. Para el análisis de secuencias se utilizaron los paquetes Seqman 4.0 (Enastar Inc.) y GeneDoc 2.5 (Copyright® 1999 by Karl Nicholas). Los DNAs que contenían las mutaciones correctas se utilizaron para transformar en células competentes *E. coli* XL1-Blue PR. *E. coli* XL1-Blue PR es una cepa XL1-Blue, previamente transformada con el plásmido pATPR, que contiene la región codificante de la proteasa del VIH-1 (**Figura 18B**). Esta enzima es necesaria para que se produzca el procesamiento de la subunidad p66 de la RT.

### **3.3 Expresión y purificación de RTs**

La purificación de las enzimas se llevó a cabo mediante un sistema de coexpresión basado en la utilización de los plásmidos pRT66B y pATPR (Boretto *et al.*, 2001; Matamoros *et al.*, 2005). Las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de las enzimas purificadas se muestran en la **Figura 17**.

#### **3.3.1 Expresión de la RT**

Se inocularon 20 ml de medio Luria-Broth (LB) que contenía ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) con una pequeña cantidad de glicerolado de células de *E. coli* XL1-Blue PR portadoras de los plásmidos pRT66B (que contenía la región codificante de la subunidad p66 de la RT) y pATPR (**Figura 18**). El cultivo se dejó creciendo toda la noche a 37 °C en agitación constante. Los 20 ml de cultivo obtenidos se añadieron a 300 ml de LB con ampicilina y kanamicina (a las mismas concentraciones indicadas anteriormente) y el cultivo se mantuvo en agitación a 37 °C durante 6 horas más, para ser finalmente repartido en 3 matraces de 1 litro cada uno, que contenían medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Una vez alcanzada una densidad óptica a 600 nm de 0,7, se añadió isopropil-β-D-tio-galactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,6 mM y se mantuvo la incubación a 37 °C durante 24 h. Pasado este tiempo, se recogieron las células por centrifugación a 3000 rpm durante 30 min a 4 °C, utilizando un rotor GS3 (Sorvall).

#### **3.3.2 Lisis de las bacterias**

Las células se resuspendieron en 20 ml de tampón de lisis [Tris-HCl 40 mM (pH 8,0) que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 25 mM, sacarosa al 10%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, benzamidina 2 mM y lisozima 1 mg/ml] y se mantuvieron a 4 °C durante 15 min en agitación constante. Pasados los 15 min, se añadieron 20 ml de un tampón que contenía NP-40 al 0,8%, ditiotretitol (DTT) 20 mM, PMSF 1 mM y benzamidina 2 mM, y se repitió la incubación a 4 °C en agitación constante durante 15 min. Finalmente, se añadió NaCl a una concentración final de 0,5 M y se sonicó la muestra durante 1 min a máxima intensidad. La muestra se centrifugó a 11000 rpm durante 15 min a 4 °C, utilizando un rotor SS-34 (Sorvall). El sobrenadante se diluyó 7 veces en tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,8) y se mantuvo a 4 °C hasta la siguiente etapa de purificación.

### 3.3.3 Cromatografía de intercambio iónico

El sobrenadante diluido se cromatografió en una columna de fosfocelulosa P11 (Whatman), que se preparó según las indicaciones del fabricante y que se equilibró con tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,8) hasta alcanzar el mismo pH del tampón. Una vez equilibrada, se aplicó la muestra y la columna se lavó con 10 volúmenes de tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,8). La enzima se eluyó con un gradiente preparado con 40 ml de tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,8) que contenía NaCl 30 mM y 40 ml de tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,8) que contenía NaCl 1 M. Se recogieron fracciones de 2 ml y se midió su absorbancia a 280 nm. Finalmente, se reunieron aquellas fracciones en las que eluyó la proteína, para a continuación llevar a cabo la cromatografía de afinidad.

### 3.3.4 Cromatografía de afinidad

La muestra obtenida se aplicó en una columna de 1,5-2 ml de Ni<sup>2+</sup>-ácido nitriloacético-agarosa (ProBond™, Invitrogen), previamente equilibrada en tampón fosfato sódico 50 mM (pH 7,8) que contenía NaCl 0,3 M. La columna se lavó 3 veces con tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,8) y 3 veces con tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 0,5 M.

La RT se eluyó con un gradiente preparado con 20 ml de tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 0,3 M e imidazol 50 mM y 20 ml de tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 0,3 M e imidazol 0,5 M. Se recogieron fracciones de 2 ml y se midió su absorbancia a 280 nm. Aquellas fracciones en las que eluyó la RT se reunieron y se dializaron tres veces frente a tampón de diálisis [Tris-HCl 50 mM (pH 7,0), NaCl 25 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, y glicerol al 10%], cambiando el medio de diálisis cada 2 h y utilizando bolsas de diálisis de tipo Visking 20/32 de 16 mm de diámetro (Serva). Finalmente, la muestra se concentró utilizando concentradores de tipo Centriprep-30 y Centricon-30 (Amicon) hasta alcanzar un volumen aproximado de 1 ml (evitando la formación de precipitado) mediante centrifugación a 4 °C en ciclos de 20 min a 3000 rpm, utilizando un rotor SS-34 (Sorvall). La RT concentrada se almacenó a -20 °C.

### 3.3.5 Comprobación de la pureza y concentración de la enzima obtenida

Antes de llevar a cabo los estudios bioquímicos con las enzimas, se estimó su pureza y el rendimiento del aislamiento mediante electroforesis en geles de poliacrilamida

y dodecilsulfato sódico (SDS). La concentración de la proteína se determinó inicialmente utilizando su coeficiente de extinción molar a 280 nm ( $\epsilon_{280} = 260450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Kati *et al.*, 1992).

### 3.4 Nucleótidos, inhibidores y preparación de complejos molde-iniciador DNA/DNA

Los complejos molde-iniciador DNA/DNA heteropoliméricos utilizados en ensayos de incorporación de dNTPs y/o escisión de inhibidores bloqueantes de iniciadores se detallan en la **Tabla 3**. Los oligonucleótidos de DNA fueron suministrados por Invitrogen Life Technologies. Todos ellos (purificados por HPLC) presentaron un alto grado de pureza.

Las soluciones “stock” (100 mM) de dNTPs se obtuvieron de GE Healthcare. Los derivados trifosfato de los NRTIs se obtuvieron de Trilink BioTechnologies (San Diego, California, EE.UU.) (AZTTP) y Sierra Bioresearch (Tucson, Arizona, EE.UU.) (3TCTP). Los NNRTIs nevirapina, efavirenz, delavirdina y etravirina se obtuvieron del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Rockville, Maryland, EE.UU.).

**Tabla 3. Complejos heteropoliméricos utilizados en los distintos ensayos.**

| Nombre       |    | Secuencia                                     |    |
|--------------|----|---|----|
| <b>31T</b>   | 5' | <b>TTTTTTTTTTAGGATACATATGGTTAAAGTAT</b>       | 3' |
| <b>21P</b>   | 3' | *CCTATGTATAACCAATTTTCATA                      | 5' |
| <b>31C</b>   | 5' | <b>TTTTTTTTTTGGGATACATATGGTTAAAGTAT</b>       | 3' |
| <b>21P</b>   | 3' | *CCTATGTATAACCAATTTTCATA                      | 5' |
| <b>D38</b>   | 5' | <b>GGGTCCTTTCTTACCTGCAAGAATGTATAGCCCTACCA</b> | 3' |
| <b>25PGA</b> | 3' | *GGACGTTCTTACATATCGGGATGGT                    | 5' |
| <b>D38G</b>  | 5' | <b>AAAATTAAATAAGATAATAAGAATGTATAGCCCTACCA</b> | 3' |
| <b>25PGG</b> | 3' | *TATTATTCTTACATATCGGGATGGT                    | 5' |

Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como molde (en negrita) y los correspondientes iniciadores, situados debajo de éstos y en letra normal.

Los iniciadores 21P, 25PGA y 25PGG se marcaron radiactivamente en su extremo 5' terminal con 1  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (Perkin Elmer) y 5 U de T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs). La reacción de marcaje de los iniciadores se realizó en presencia de un tampón Tris-HCl 70 mM (pH 7,5) que contenía  $\text{MgCl}_2$  10 mM y DTT 5 mM. Tras

incubar durante 45 min a 37 °C, se comprobó la incorporación de fósforo radiactivo al oligonucleótido mediante cromatografía en placas de PEI-celulosa (TLC 20 x 20 cm; Merck) utilizando fosfato disódico 0,5 M para su separación. Posteriormente, se inactivó la polinucleótido quinasa mediante una incubación de 10 min a 90 °C. Los complejos molde-iniciador D38/25PGA y D38/25PGG se hibridaron en una disolución de NaCl 150 mM y acetato de magnesio 150 mM, mediante incubación a 95 °C durante 4 min y posterior enfriamiento lento hasta alcanzar temperatura ambiente. Previamente a su uso, para los ensayos de enzima activa y escisión, estos complejos molde-iniciador se diluyeron a la concentración deseada en tampón HEPES 500 mM (pH 7,0) conteniendo NaCl 150 mM y acetato de magnesio 150 mM. Para los estudios de disociación en presencia de urea, afinidad de la RT por el DNA o nevirapina, así como para los ensayos de  $CI_{50}$  con NNRTIs, se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA, que se diluyó a la concentración deseada en tampón HEPES 50 mM (pH 7,0) conteniendo NaCl 15 mM y acetato de magnesio 15 mM.

En los estudios cinéticos llevados a cabo en el estado pre-estacionario y estacionario, para determinar la incorporación del dTTP y dCTP, se utilizaron los complejos molde-iniciador 31T/21P y 31C/21P, respectivamente. La hibridación de ambos complejos molde-iniciador se realizó en agua, en las mismas condiciones de tiempo y temperatura indicadas anteriormente. Los híbridos se prepararon a la concentración necesaria para ser utilizados en el ensayo.

### 3.4.1 Preparación del iniciador bloqueado con AZT

El molde-iniciador marcado en el extremo 5' del primer D38/25PGA (2  $\mu$ M) se incubó con la RT a 6 nM y AZTTP 125  $\mu$ M en tampón de reacción Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), KCl 50 mM y  $MgCl_2$  12,5 mM durante 60 min a 37 °C en un volumen final de 48  $\mu$ l. La reacción se detuvo añadiendo un volumen equivalente de una disolución de formamida al 90% que contenía EDTA 10 mM. La muestra que contiene el complejo molde-iniciador bloqueado con AZT se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M. Posteriormente se identificó el DNA (oligonucleótido marcado) utilizando placas fotosensibles y un analizador de imagen *BAS1500* (Fujifilm), y se cortó para su posterior purificación.

El oligonucleótido marcado se extrajo tras añadir a la acrilamida extraída (aproximadamente 150  $\mu$ l) dos volúmenes de tampón de elución [acetato de amonio 0,5 M, acetato de magnesio 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0) y SDS al 0,1%]. Tras dejar el DNA

en agitación a 37 °C durante 12-16 horas, la muestra se centrifugó a 4 °C durante 1 min a 14000 rpm en una centrífuga Eppendorf. Se retiró el sobrenadante y al sedimento resultante se le añadieron 0,5 ml de tampón de elución. Con el fin de eliminar partículas de acrilamida presentes en la disolución, ambos sobrenadantes se filtraron a través de papel Whatman GF/C.

La muestra resultante se precipitó con 2 volúmenes de etanol a 4 °C, manteniéndose durante 30 min en hielo. El DNA (oligonucleótido marcado) fue recuperado tras centrifugar la muestra a 4 °C durante 10 min a 14000 rpm en una centrífuga Eppendorf. Después de eliminar el sobrenadante, el DNA se redisolvió en 200 µl de tampón Tris-EDTA (pH 7,6) y 25 µl de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y se reprecipitó con 450 µl de etanol del mismo modo descrito anteriormente. El DNA (oligonucleótido marcado) fue recuperado tras centrifugar a 4 °C durante 10 min a 14000 rpm en una centrífuga Eppendorf. Tras la eliminación del sobrenadante, el sedimento se lavó con 300 µl de etanol al 70% para ser centrifugado por última vez durante 10 min a 14000 rpm a 4 °C.

Finalmente, se eliminó el sobrenadante y después de dejarlo secando toda la noche a 37 °C, el DNA se resuspendió en 100 µl de agua MiliQ. La concentración del oligonucleótido marcado obtenido se determinó mediante electroforesis en geles de acrilamida (se obtiene aproximadamente el 15% del material de partida).

### **3.5 Determinación de la concentración de enzima activa**

La determinación de la concentración de enzima activa se realizó con todas las RTs y con el complejo molde-iniciador D38/25PGA, que se preparó siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.3.

El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl. Se incubó durante 10 min a 37 °C una mezcla preparada con 10 µl de una disolución de RT (12 nM) y el híbrido correspondiente a una concentración 2x (60 nM) en tampón HEPES 100 mM (pH 7,0) que contenía acetato potásico 130 mM, NaCl 30 mM, acetato magnésico 30 mM, DTT 1 mM, polietilenglicol 6000 al 5%. Tras esta etapa de incubación, se añadieron a la mezcla 10 µl del nucleótido a incorporar en la posición +1 del iniciador (dTTP) a 500 µM, disuelto en acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol 6000 al 5%.

Se retiraron alícuotas de 4 µl a los 10, 20, 30 y 40 s del inicio de las reacciones, que se mezclaron con 4 µl de solución de parada de la reacción [EDTA 10 mM en



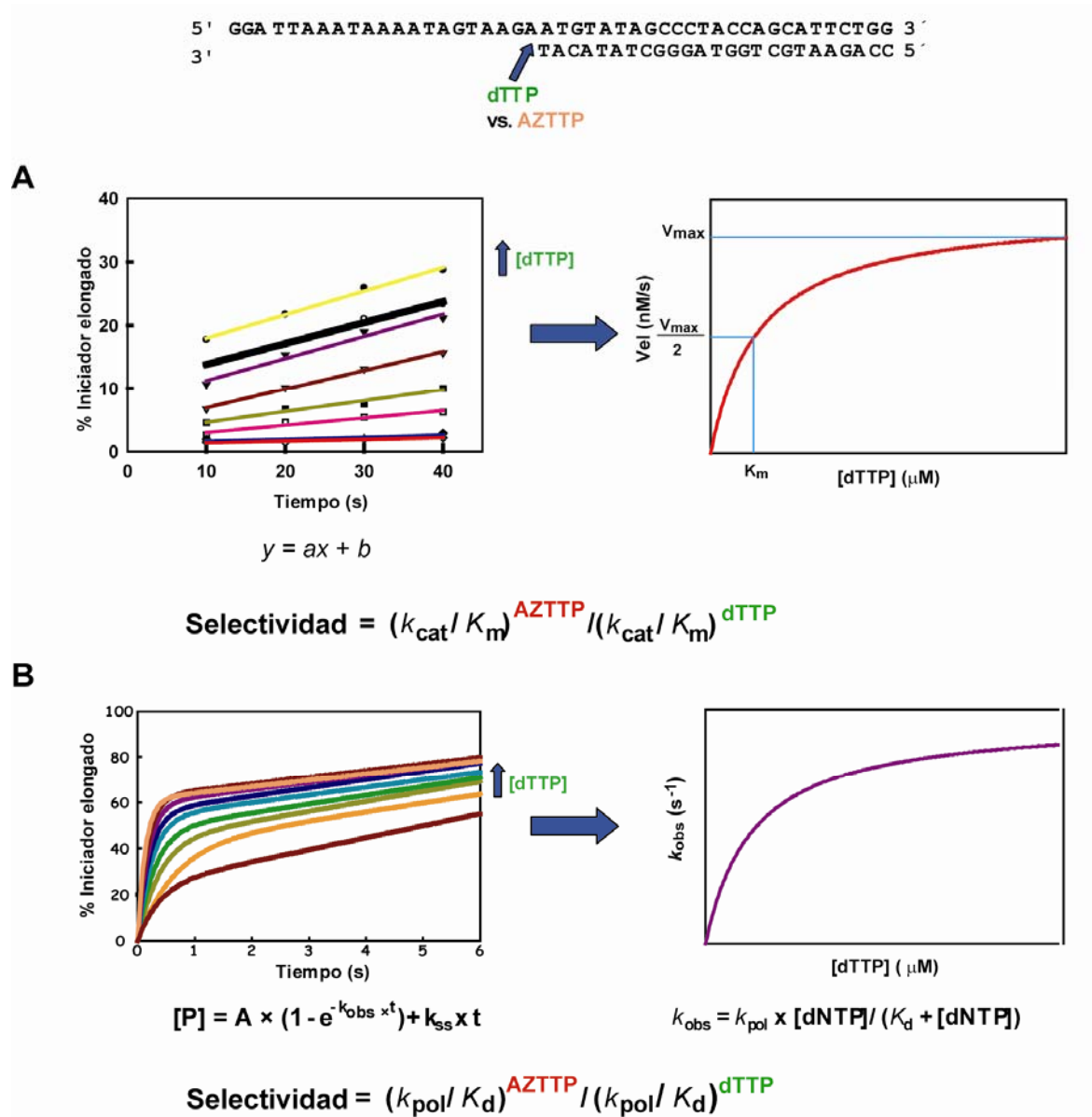
formamida al 90%, conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)] y se incubaron durante 10 min a 90 °C. Los productos de las reacciones se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M.

Los geles se expusieron a placas fotosensibles (Fujifilm BAS-MP 2040S) y las intensidades de las bandas correspondientes al iniciador elongado en un nucleótido y al iniciador no elongado se midieron en un analizador de imagen *BAS1500* (Fujifilm) usando el programa Tina versión 2.09 (Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Straubenhardt, Alemania). Se representaron los valores correspondientes al porcentaje del iniciador total elongado a los distintos tiempos de incubación (10, 20, 30 y 40 s), ajustándose a una recta del tipo  $y = ax + b$ , donde  $y$  es el porcentaje de iniciador elongado, y  $x$  es el tiempo de reacción transcurrido. El parámetro  $a$  representa la tasa de formación de producto y  $b$  el porcentaje de molde-iniciador unido a la RT a tiempo cero. Este porcentaje multiplicado por la concentración de híbrido en el ensayo es igual a la concentración de enzima activa en el mismo.

### 3.6 Ensayos cinéticos

Los ensayos de incorporación en el estado estacionario, se basan en la determinación de las constantes cinéticas ( $k_{cat}$  y  $K_m$ ) para la incorporación de dNTPs en el extremo 3' de un iniciador y proporcionan una estimación de la selectividad de la RT por el nucleótido (Goodman *et al.*, 1993). La determinación de los parámetros cinéticos se lleva a cabo midiendo la incorporación de nucleótidos en el extremo 3' del iniciador, previamente marcado en su extremo 5' con [ $\gamma^{32}P$ ]ATP, en presencia de distintas concentraciones de dNTP, una vez formado el complejo binario RT•molde-iniciador. Los productos resultantes son analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y urea. Los datos obtenidos se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten, y se determinan los parámetros  $k_{cat}$  (tasa de incorporación) y  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) para el dNTP y el NRTI trifosforilado (**Figura 19**). La selectividad se define como la relación entre la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) obtenida para el NRTI trifosforilado y la eficacia catalítica obtenida para el dNTP correcto.

Una de las limitaciones que presenta la interpretación de los datos proporcionados por los ensayos bioquímicos en el estado estacionario radica en que no se pueden determinar de forma precisa las constantes cinéticas de afinidad y de polimerización ( $K_d$  y  $k_{pol}$ , respectivamente). En los ensayos realizados en fase estacionaria, los valores de  $k_{cat}$



**Figura 19. Determinación de los parámetros cinéticos de incorporación de nucleótidos sobre un complejo molde-iniciador DNA/DNA heteropolimérico, en estado estacionario (A) y en estado pre-estacionario (B).** Se muestra un ejemplo en el que se mide la incorporación de dTTP. **(A)** En el estado estacionario, los porcentajes de iniciador elongado a los 10, 20, 30 y 40 s, obtenidos de las reacciones llevadas a cabo en presencia de concentraciones crecientes de dTTP (gráfica de la izquierda), se ajustaron a la ecuación lineal  $y = ax + b$ , donde  $y$  es el porcentaje de iniciador elongado,  $x$  es el tiempo de reacción transcurrido y los parámetros  $a$  y  $b$  representan la velocidad de formación de producto y el porcentaje de molde-iniciador unido a la RT a tiempo cero, respectivamente. Los valores de la tasa de formación de producto obtenidos a diferentes concentraciones de dTTP se ajustan a una curva de Michaelis-Menten, de la cual se obtienen los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$ , para el nucleótido y la enzima en estudio.  $k_{cat} = V_{max}/[E]$ , donde  $[E]$  es la concentración de enzima activa utilizada en el ensayo. La selectividad de nucleótido se obtiene mediante el cociente de la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) del AZTTP respecto al dTTP, en este caso. **(B)** En el estado pre-estacionario, los productos elongados a tiempos muy cortos (hasta 6 s) obtenidos de las reacciones a concentraciones crecientes de dTTP (gráfica de la izquierda), se ajustan a la ecuación de la izquierda, donde  $A$  es la amplitud,  $k_{obs}$  es la constante aparente de formación del enlace fosfodiéster y  $k_{ss}$  es la tasa de recambio de la enzima. La dependencia de  $k_{obs}$  con la concentración de dTTP viene dada por la ecuación hipérbolica de la derecha, donde  $k_{pol}$  y  $K_d$  son las constantes catalítica y de afinidad para la incorporación del dTTP, respectivamente. La selectividad de la enzima se obtiene de la misma manera que en el estado estacionario, pero usando el cociente  $k_{pol}/K_d$  para el AZTTP respecto al dTTP, en este caso.

y  $K_m$  obtenidos dependen de la disociación entre la enzima y el complejo molde-iniciador ( $k_{off}$ ). Por lo tanto, los valores de  $k_{cat}$  y de “afinidad” por el nucleótido ( $K_m$  aparente) podrían no reflejar constantes cinéticas de incorporación directa de dNTP. La dependencia entre  $K_m$  y  $K_d$  viene dada por la ecuación:  $K_m = K_d(k_{off}/k_{pol})$  (Wilson *et al.*, 1996).

Por esta razón, se realizan medidas de incorporación mediante ensayos cinéticos en el estado pre-estacionario. Estos ensayos examinan la capacidad de la polimerasa para unirse e incorporar el dNTP a tiempos muy cortos (milisegundos). De esta forma, es posible el cálculo de la constante de afinidad ( $K_d$ ) para la interacción entre el dNTP y el complejo binario RT•molde-iniciador, y de la constante de polimerización ( $k_{pol}$ ). La eficacia catalítica se determina a partir de la relación  $k_{pol}/K_d$  (Kati *et al.*, 1992) (**Figura 19**).

### 3.6.1 Ensayos cinéticos de incorporación de nucleótidos en el estado pre-estacionario

#### 3.6.1.1 Incorporación de dNTPs correctos

Se determinaron los parámetros cinéticos para la incorporación de dNTP en el estado pre-estacionario para las enzimas WT (NL4-3), MDR\_69T, MDR\_Δ69, MDR\_69A, T69A, Δ69 y GΔ69G. Para ello, se utilizó el complejo molde-iniciador 31T/21P. Para las enzimas WT (NL4-3), Δ69 y T69A se determinaron además los parámetros cinéticos de incorporación de dCTP, utilizando el complejo 31C/21P. La obtención de ambos complejos molde-iniciador ha sido descrita en el apartado 3.3. Los ensayos se realizaron utilizando un aparato de “Quench Flow” modelo QFM-400 (Bio-Logic Science Instruments, Francia), estableciendo tiempos de incubación de 25 ms a 6 s (Kati *et al.*, 1992; Matamoros *et al.*, 2008).

Para la incorporación de dTTP y dCTP, las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C mezclando 12 μl de una solución que contenía enzima activa a una concentración de 100 nM y complejo molde iniciador (31T/21P o 31C/21P, dependiendo del ensayo) a 200 nM, en tampón de reacción [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), KCl 50 mM] con 12 μl del mismo tampón conteniendo concentraciones crecientes de dNTPs (dTTP o dCTP, dependiendo del ensayo) en presencia de MgCl<sub>2</sub> 25 mM.

Las reacciones se pararon añadiendo 12 μl de EDTA 0,9 M a diferentes tiempos en un intervalo comprendido entre 25 y 6000 ms, incubándose a continuación las muestras a 90 °C durante 5 min. Los productos de reacción se sometieron a

electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M. Los resultados se cuantificaron utilizando placas fotosensibles y un analizador de imagen *BAS1500* usando el programa Tina versión 2.09.

La formación de producto ([P]) frente al tiempo (*t*) se ajustó a la siguiente ecuación:

$$[P] = A \times (1 - e^{-k_{obs} \times t}) + k_{ss} \times t \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde *A* es la amplitud, *k<sub>obs</sub>* es la constante cinética aparente de formación del enlace fosfodiéster y *k<sub>ss</sub>* es la tasa de recambio de la enzima, equivalente a la constante cinética de la fase estacionaria.

La dependencia de *k<sub>obs</sub>* en función de la concentración de dNTP está descrita por la siguiente ecuación hiperbólica:

$$k_{obs} = k_{pol} \times [dNTP] / (K_d + [dNTP]) \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde *K<sub>d</sub>* y *k<sub>pol</sub>* son las constantes de afinidad de dNTP por la RT y catalítica de la reacción de polimerización, respectivamente. Estos parámetros se determinaron ajustando las curvas con el programa SigmaPlot 2001 (Systat Software, Inc.). *k<sub>pol</sub>/K<sub>d</sub>*, se define como la eficacia catalítica de incorporación de nucleótido para la enzima correspondiente.

### **3.6.1.2 Incorporación de NRTIs trifosforilados**

Estos ensayos se basan en la determinación de los parámetros cinéticos en el estado pre-estacionario para la incorporación de NRTIs. En este caso se midieron los parámetros cinéticos de incorporación de AZTTP y de 3TCTP para las enzimas WT (NL4-3), T69A y Δ69, utilizando como complejos molde-iniciador 31T/21P y 31C/21P, respectivamente.

Las reacciones de incorporación de AZTTP se realizaron bajo las mismas condiciones descritas para la incorporación de un nucleótido correcto salvo por la concentración de enzima que se añadió en exceso (200 nM final) con respecto al molde-iniciador (100 nM final).

Para el 3TCTP, las reacciones de incorporación se llevaron a cabo en un rango de tiempo de 10 s a 5 min y la enzima se añadió a una concentración final de 300 nM. Estos ensayos se realizaron manualmente mezclando 5 µl de tampón de reacción conteniendo la RT y el molde-iniciador, y 5 µl del mismo tampón conteniendo el dNTP y MgCl<sub>2</sub>. Las reacciones se detuvieron a distintos tiempos con 10 µl de solución de parada [EDTA 10 mM en formamida al 90%, conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)].

Los productos de la reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M. El análisis de los datos se llevó a cabo de la misma manera que la descrita en el apartado anterior.

La formación de producto ([P]) frente al tiempo (*t*) se ajustó a la ecuación:

$$[P] = A \times (1 - e^{-k_{obs} \times t})$$

donde *A* es la amplitud, *k<sub>obs</sub>* es la constante cinética aparente de formación del enlace fosfodiéster. Las concentraciones tanto de enzima como de molde-iniciador utilizadas en los ensayos de incorporación de 3TCTP, se seleccionaron con el fin de eliminar la influencia de la tasa de recambio de la enzima (*k<sub>ss</sub>*), ya que esta interfiere en la medida de constantes cinéticas a bajas tasas de incorporación. En los ensayos de incorporación de AZTTP los datos se ajustaron a la Ecuación 1 (apartado 3.6.1.1).

La determinación de *K<sub>d</sub>* y *k<sub>pol</sub>* para cada enzima y el correspondiente NRTI se llevó a cabo utilizando la Ecuación 2 descrita en el apartado 3.6.1.1. Así, se obtuvo una estimación de la selectividad de la enzima comparando los parámetros cinéticos obtenidos con los NRTIs trifosforilados y con los nucleótidos correctos. La selectividad se define como:

$$\text{Selectividad} = [k_{pol}/K_d (\text{NRTI trifosforilado})]/[k_{pol}/K_d (\text{dNTP})]$$

### 3.6.2 Ensayos cinéticos de incorporación de nucleótido en el estado estacionario

Estos ensayos se basan en la determinación de los parámetros cinéticos para la incorporación de dNTPs correctos y de NRTIs trifosforilados sobre un complejo molde-iniciador en el estado estacionario. Se determinaron las constantes cinéticas para la RT WT (NL4-3) en ensayos de incorporación de dTTP y para las RTs WT (NL4-3),

C\_Q151M, MDR\_69T, MDR\_T69A y MDR\_Δ69 en ensayos de incorporación de AZTTP. Se utilizó el complejo molde-iniciador 31T/21P, siendo el dNTP correcto el dTTP y el AZTTP el NRTI trifosforilado. Las concentraciones finales de enzima activa y de complejo molde-iniciador en el ensayo fueron de 24-80 nM y 100 nM, respectivamente.

Se preincubó durante 10 min a 37 °C una mezcla preparada con 20 µl de una disolución de RT y el complejo molde-iniciador en tampón de reacción [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), KCl 50 mM]. La reacción se inició mediante la adición de 20 µl de tampón de reacción conteniendo diferentes concentraciones de dNTP (en un rango de 0,015 a 250 µM) en presencia de MgCl<sub>2</sub> 25 mM. Después de la incubación de las muestras a 37 °C durante 10, 20, 30 y 40 s, se recogieron alícuotas de 8 µl y se añadieron a 8 µl de solución de parada [EDTA 10 mM en formamida al 90%, conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)]. Las muestras se calentaron durante 10 min a 90 °C y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M. Los resultados se cuantificaron utilizando placas fotosensibles y un analizador de imagen *BAS1500*, tal como se indica en el apartado 3.5.

La tasa de formación de producto se determinó a 10-12 concentraciones diferentes de AZTTP o dTTP, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5. Las velocidades de incorporación de nucleótido por unidad de tiempo a distintas concentraciones de dNTPs se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, y las constantes cinéticas  $k_{cat}$  (constante catalítica) y  $K_m$ , (constante de Michaelis aparente) se determinaron para cada enzima y el dNTP o NRTI trifosforilado correspondiente. De esta manera se obtuvo una estimación de la resistencia al AZTTP, comparando la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) obtenida para la enzima WT (NL4-3) con las obtenidas para las enzimas multirresistentes.

### 3.6.3 Ensayos de estabilidad del heterodímero de la RT en presencia de urea

Estos ensayos se basan en la determinación de la concentración de urea en la que el 50% de la enzima se encuentra inhibida ( $CI_{50}$ ). Se determinaron los valores de  $CI_{50}$  para las enzimas WT (NL4-3), MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_Δ69 y MDR\_Δ69/S163I sobre el complejo molde-iniciador D38/25PGA. Las concentraciones finales de enzima y complejo molde-iniciador en el ensayo fueron de 30 a 50 nM y 30 nM, respectivamente.

Se preincubó la RT con diferentes concentraciones de urea (en un rango de 0 a 3 M) durante 10 min a 37 °C en 10 µl de tampón HEPES 12 mM (pH 7,0) conteniendo NaCl 6 mM, acetato magnésico 6 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol

6000 al 5%. La reacción de polimerización se inició mediante la adición del complejo molde-iniciador (60 nM) y dTTP 50  $\mu$ M, disueltos en 10  $\mu$ l de tampón HEPES 12 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 6 mM, acetato magnésico 6 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol 6000 al 5%, y la concentración de urea correspondiente (en un rango de 0 a 3 M).

Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 20 s y la reacción se detuvo mediante la adición de 10  $\mu$ l de solución de parada [EDTA 10 mM en formamida al 90%, conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)]. Los tiempos de incubación utilizados estaban dentro del rango lineal de la cinética correspondiente. Las muestras se calentaron posteriormente durante 10 min a 90 °C. Los productos de las reacciones se analizaron tras realizar electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M. Los geles se expusieron a placas fotosensibles y las intensidades de las bandas correspondientes al iniciador elongado en un nucleótido y al iniciador no elongado se midieron en un analizador de imagen *BAS1500*, usando el programa Tina versión 2.09 (Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Straubenhardt, Alemania). El porcentaje de iniciador elongado frente a la concentración de urea se ajustó a una curva logística utilizando el programa SigmaPlot 2001 para determinar la  $CI_{50}$ .

### 3.6.4 Determinación de la $CI_{50}$ de NNRTIs

Estos ensayos se basan en la determinación de la  $CI_{50}$  de NNRTIs, utilizando el complejo molde-iniciador D38/25PGA correctamente apareado, en las condiciones descritas en el apartado 3.4. Se estudió el efecto inhibitorio de nevirapina, delavirdina, efavirenz y etravirina sobre las RTs WT (NL4-3), A376S y K103N y de efavirenz sobre los mutantes MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_Δ69 y MDR\_Δ69/S163I.

La enzima (30-50 nM) y el complejo molde-iniciador (75 nM) se mezclaron en 66  $\mu$ l de un tampón HEPES 15 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 7,5 mM, acetato magnésico 7,5 mM, acetato potásico 260 mM, DTT 2 mM, polietilenglicol 6000 al 10% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 2%.

Después de preincubar el complejo RT/molde-iniciador, se mezclaron alícuotas de 4  $\mu$ l con el mismo volumen del NNRTI correspondiente, diluido en 10% DMSO. Las mezclas se incubaron durante 10 min a 37 °C. El rango de concentración utilizado para los NNRTIs varió dependiendo tanto del inhibidor como de la enzima (**Tabla 4**).

**Tabla 4. Concentraciones de NNRTIs en los ensayos de determinación de  $CI_{50}$ .**

| Enzima            | Concentración NNRTIs ( $\mu$ M) |             |           |            |
|-------------------|---------------------------------|-------------|-----------|------------|
|                   | Nevirapina                      | Delavirdina | Efavirenz | Etravirina |
| <b>WT (NL4-3)</b> | 0 - 100                         | 0 - 100     | 0 - 4     | 0 - 4      |
| <b>MDRs</b>       | -                               | -           | 0 - 1600  | -          |
| <b>K103N</b>      | 0 - 1600                        | 0 - 1600    | 0 - 320   | 0 - 4      |
| <b>A376S</b>      | 0 - 1600                        | 0 - 100     | 0 - 4     | 0 - 4      |

Una vez incubado el complejo enzima/molde-iniciador con el inhibidor, se inició la reacción añadiendo 2  $\mu$ l de tampón HEPES 7,5 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 3,75 mM, acetato magnésico 3,75 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM, polietilenglicol 5%, DMSO al 1% y dTTP a 25  $\mu$ M. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 20 s y la reacción se detuvo mediante la adición de 10  $\mu$ l de solución de parada [EDTA 10 mM en formamida al 90%, conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)]. Los tiempos de incubación utilizados estaban dentro del rango lineal de la cinética correspondiente. Las muestras se calentaron posteriormente durante 10 min a 90 °C. Los productos de las reacciones se analizaron tras electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M. Los geles se expusieron a placas fotosensibles y las intensidades de las bandas correspondientes al iniciador elongado en un nucleótido y al iniciador no elongado se midieron en un analizador de imagen *BAS 1500* utilizando el programa Tina versión 2.09. La  $CI_{50}$  se determinó a partir del mejor ajuste de los datos a una curva dosis-respuesta utilizando el programa SigmaPlot 2001.

### 3.6.5 Inhibición de las RTs por foscarnet y fosfonoacetato

Estos ensayos se basan en la determinación de la  $CI_{50}$  para dos análogos a pirofosfato (foscarnet y fosfonoacetato). Los ensayos se realizaron sobre el complejo molde-iniciador 31T/21P y se determinaron los valores de  $CI_{50}$  para las RTs WT (NL4-3), T69A,  $\Delta$ 69 y MDR\_ $\Delta$ 69.

Las reacciones se llevaron a cabo en 20  $\mu$ l de tampón de reacción [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), KCl 50 mM]. La concentración final de enzima activa y complejo molde-iniciador fue de 12-40 nM y 100 nM, respectivamente.



La reacción se inició mediante la incubación de la mezcla con la enzima y el complejo molde-iniciador durante 10 min a 37 °C en ausencia de nucleótidos, seguida de la adición de 20 µl de tampón de reacción [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), KCl 50 mM] conteniendo dTTP o AZTTP (5 µM final) y diferentes concentraciones de foscarnet o fosfonoacetato en presencia de MgCl<sub>2</sub> 25 mM. Las concentraciones finales de foscarnet y fosfonoacetato se mantuvieron en rangos de 0-10 mM y 0-200 mM, respectivamente. Las muestras se incubaron durante 30 s y la reacción se detuvo mediante la adición de 40 µl de solución de parada [EDTA 10 mM en formamida al 90%, conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)]. Las muestras se calentaron durante 10 min a 90 °C. Los productos fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 20 % conteniendo urea 8 M. Los resultados se cuantificaron utilizando placas fotosensibles y un analizador de imagen *BAS1500* (Fujifilm). La inhibición por foscarnet y fosfonoacetato se estimó después de determinar la cantidad de iniciador alargado a diferentes concentraciones de los inhibidores y compararla con la obtenida en ausencia de foscarnet o fosfonoacetato. Los tiempos de incubación utilizados estaban dentro del rango lineal de la cinética de incorporación de nucleótido correspondiente. Se representó la cantidad de iniciador extendido por unidad de tiempo (producto) frente a la concentración de foscarnet y fosfonoacetato, y los datos se ajustaron a una curva dosis-respuesta para obtener la  $CI_{50}$  correspondiente.

### 3.6.6 Ensayos de afinidad por el DNA

Estos ensayos se basan en la determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la RT por el DNA. Se utilizaron las enzimas WT (NL4-3), A376S y K103N y el complejo molde-iniciador D38/25PGA. La concentración final de enzima activa en el ensayo fue de 2 a 8 nM y las concentraciones finales de complejo molde-iniciador se mantuvieron en el rango de 1,875 a 60 nM.

Se preincubó durante 10 min a 37 °C una solución que contenía 8 µl de la RT y 8 µl de concentraciones crecientes del complejo molde-iniciador D38/25PGA en tampón HEPES 25 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 15 mM, acetato magnésico 15 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM, polietilenglicol 6000 al 5% y DMSO al 1%. La reacción se inició mediante la adición de 4 µl de tampón de reacción [HEPES 7,5 mM (pH 7,0) conteniendo NaCl 3,75 mM, acetato magnésico 3,75 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM, polietilenglicol 6000 al 5% y DMSO al 1%], que contenía además dTTP a 125 µM. Se incubó la muestra a 37 °C y se recogieron alícuotas de 4 µl a los 10, 20, 30 y 40 s, que se mezclaron con 4 µl de solución de parada [EDTA 10 mM en formamida al 90%,

conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)] y se incubaron posteriormente durante 10 min a 90 °C. Los productos de las reacciones se analizaron tras electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M.

Los geles se expusieron a placas fotosensibles y las intensidades de las bandas correspondientes al iniciador elongado en un nucleótido y al iniciador no elongado se midieron en un analizador de imagen *BAS1500* utilizando el programa Tina versión 2.09. Se determinó el porcentaje de molde-iniciador unido a la RT a tiempo cero para cada concentración de D38/25PGA utilizada que, multiplicada por la concentración de D38/25PGA, nos da la concentración de enzima activa unida al DNA.

La concentración de enzima activa unida a D38/25PGA ( $[E \cdot \text{DNA}]$ ) a diferentes concentraciones de D38/25PGA se ajustó a la siguiente ecuación:

$$[E \cdot \text{DNA}] = 0,5 \times [(K_d + E_T + TP) - \sqrt{(K_d + E_T + TP)^2 - (4 \times E_T \times TP)}]$$

donde  $E_T$  y TP serían la concentración de enzima activa total y la concentración de complejo molde-iniciador (libre y unido) utilizada en el ensayo, respectivamente. La  $K_d$  sería la constante de equilibrio de disociación de la enzima por el DNA. Esta constante se determinó utilizando el programa SigmaPlot 2001.

### **3.6.7 Ensayos de afinidad por nevirapina**

Estos ensayos se basan en la determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la RT con nevirapina. Se utilizaron las enzimas WT (NL4-3) y A376S, y los complejos molde-iniciador D38/25PGA y 31T/21P. La concentración final tanto de enzima activa como de complejo molde-iniciador en el ensayo fue de 30 nM.

Se preincubó la RT con el complejo molde-iniciador D38/25PGA a 37 °C durante 10 min en tampón HEPES 15 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 7,5 mM, acetato magnésico 7,5 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM, polietilenglicol 6000 al 5% y DMSO al 1%. Después de la preincubación anterior, se mezclaron alícuotas de 6 µl con el mismo volumen de concentraciones crecientes de nevirapina (de 0 a 750 µM), diluida en DMSO al 10%. Las mezclas se incubaron durante 10 min a 37 °C. La reacción se inició mediante la adición de 3 µl de tampón de reacción [HEPES 7,5 mM (pH 7,0), NaCl 3,75 mM, acetato magnésico 3,75 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM, polietilenglicol

6000 al 5% y DMSO al 1%], que contenía dTTP a 125  $\mu$ M. Se incubó la muestra a 37 °C y se recogieron alícuotas de 4  $\mu$ l a los 10, 20, 30 y 40 s, que se mezclaron con 4  $\mu$ l de solución de parada [EDTA 10 mM en formamida al 90%, conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)] y se incubaron posteriormente durante 10 min a 90 °C. Los productos de las reacciones se analizaron tras electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M.

Se determinó también, la constante de disociación ( $K_d$ ) de la RT WT (NL4-3) con nevirapina utilizando el complejo molde-iniciador 31T/21P. Se preincubó la RT durante 10 min a 37 °C en tampón de reacción [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), KCl 50 mM], en presencia de  $MgCl_2$  10 mM. Las concentraciones finales de enzima activa y de complejo molde-iniciador en el ensayo fueron de 25 nM y 50 nM, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo bajo el mismo procedimiento descrito anteriormente. El rango de concentración de nevirapina utilizado fue de 0 a 100  $\mu$ M y la concentración final de dTTP fue de 75  $\mu$ M.

Los geles se expusieron a placas fotosensibles y las intensidades de las bandas correspondientes al iniciador elongado en un nucleótido y al iniciador no elongado se midieron en un analizador de imagen *BAS1500* utilizando el programa Tina versión 2.09. Se determinó el porcentaje de molde-iniciador unido a la RT a tiempo cero que, multiplicado por la concentración del complejo molde-iniciador, nos indica la concentración de enzima unida al DNA para cada concentración de nevirapina utilizada.

Para determinar la  $K_d$  para el NNRTI, se obtuvo la concentración de enzima unida al complejo molde-iniciador (D38/25PGA o 31T/21P) ([E•DNA]) a diferentes concentraciones de nevirapina y los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación:

$$[E \cdot DNA] = E_T - \left\{ 0,5 \times [(K_d + E_T + I) - \sqrt{(K_d + E_T + I)^2 - (4 \times E_T \times I)}] \right\}$$

donde  $E_T$  e  $I$  serían la concentración de enzima activa total y la concentración de inhibidor utilizadas en el ensayo, respectivamente (Xia *et al.*, 2007). La  $K_d$  sería la constante de equilibrio de disociación de la enzima con el inhibidor. Esta constante se determinó utilizando el programa SigmaPlot 2001.

### **3.7 Ensayos de rescate de iniciadores bloqueados con NRTIs**

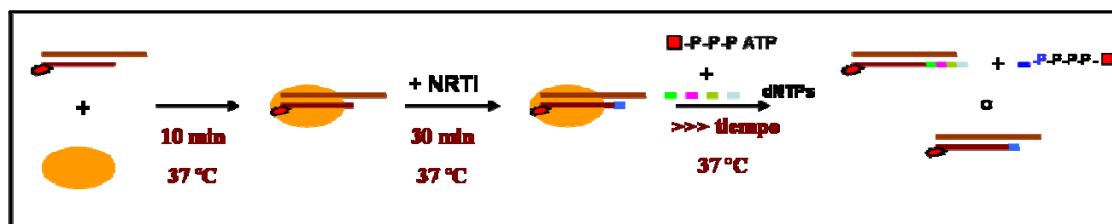
Estos ensayos tienen como objetivo analizar la capacidad de las enzimas para escindir un NRTI del extremo 3' del iniciador. Se determinó la capacidad de escisión de NRTIs de las RTs WT (NL4-3 y BH10), MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_Δ69, MDR\_Δ69/I75V, C\_Q151M, T69A, Δ69, Δ69/K219E, GΔ69G (S68G/Δ69/K70G), GΔ69G/K219E (S68G/Δ69/K70G/K219E), Δ67GR (Δ67/T69G/K70R), Δ67GR/K219E (Δ67/T69G/K70R/K219E), M41L/T215Y, GΔ69G\_LY (M41L/S68G/Δ69/K70G/T215Y) y Δ67GR\_LY (M41L/Δ67/T69G/K70R/T215Y). Para ello, se utilizó el complejo heteropolimérico D38/25PGA para AZTTP y d4TTP y D38G/25PGG para 3TCTP. Ambos se prepararon siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.4.

Para eliminar cualquier traza de PPi, todos los derivados de trifosfato de los NRTIs y los dNTPs fueron tratados con pirofosfatasa (Roche) antes de ser utilizados. La pirofosfatasa se eliminó después de una incubación de una hora a 37 °C, mediante centrifugación a 4 °C en ciclos de 20 min, utilizando concentradores de tipo Microcon-10 y Centricon-10 (Amicon) (Mas *et al.*, 2002).

El complejo que contenía el iniciador fosforilado (30 nM) se preincubó a 37 °C durante 10 min en 20 µl de tampón HEPES 50 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 15 mM, acetato magnésico 15 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol 6000 al 5% (tampón de preincubación) con 5 µl de la RT correspondiente (**Figura 20**). La concentración final de enzima activa en el ensayo fue de 24 y 72 nM (ensayos con PPi y ATP, respectivamente) y la concentración de complejo molde-iniciador fue de 30 nM.

Las reacciones se iniciaron añadiendo el mismo volumen (25 µl) de tampón de preincubación que contenía el inhibidor trifosfato (AZTTP, d4TTP o 3TCTP). Las concentraciones finales de NRTIs fueron 25 µM para AZTTP y d4TTP y 200 µM para 3TCTP. Tras incubar las muestras durante 30 min a 37 °C, las reacciones de rescate se iniciaron añadiendo 40 µl de una mezcla de dNTPs y el correspondiente donador de PPi, en el tampón indicado anteriormente. La concentración final de PPi fue de 20 µM a 500 µM dependiendo del ensayo, mientras que el ATP se suministró a 3,2 mM. Las reacciones de rescate se llevaron a cabo en presencia de una concentración de 100 µM de cada dNTP, a excepción del siguiente dNTP complementario (dATP, bajo nuestras condiciones de ensayo) que fue suministrado a 1 µM, concentración necesaria para minimizar sus efectos inhibitorios en la eficiencia de las reacciones de rescate. Las reacciones fueron incubadas hasta 2 h y se retiraron alícuotas de 4 µl a distintos tiempos,

que se mezclaron con 4  $\mu$ l de solución de parada [EDTA 10 mM en formamida al 90%, conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)] y se incubaron posteriormente durante 10 min a 90 °C. Los productos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 20 % conteniendo urea 8 M. Los geles se expusieron a placas fotosensibles y las intensidades de las bandas correspondientes al iniciador elongado y al iniciador no elongado se midieron en un analizador de imagen *BAS1500* usando el programa Tina versión 2.09.



**Figura 20. Esquema de la reacción de bloqueo con inhibidores y posterior escisión y polimerización.** La reacción se inicia con la adición del inhibidor tras la incubación de la RT con el complejo molde-iniciador durante 10 min a 37 °C. Una vez añadido el inhibidor, se añade el donador de PPi (ATP, en este caso) y todos los dNTPs. Dependiendo de la capacidad de la RT para desbloquear el iniciador se obtendrá más o menos cantidad de producto elongado.

El efecto inhibitorio por el siguiente nucleótido complementario (dATP) se determinó después de medir la cantidad de iniciador rescatado en reacciones incubadas a diferentes concentraciones de dATP entre 1 y 1000  $\mu$ M, en un rango de tiempo de 0 a 5 min. Los tiempos de incubación estuvieron dentro del rango lineal de la cinética correspondiente. La reacción se detuvo añadiendo 4  $\mu$ l de solución de parada [EDTA 10 mM en formamida al 90%, conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)] y calentando la muestra durante 5 min a 90 °C. Los productos de la reacción se analizaron y cuantificaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente. El porcentaje de inhibición fue representado frente a la concentración de dATP y los datos se ajustaron a una ecuación hiperbólica para obtener la  $CI_{50}$  para cada enzima analizada.

### 3.7.1 Ensayos de escisión de AZTMP en presencia de foscarnet, en condiciones de estado pre-estacionario

En estas condiciones, se determinaron los parámetros cinéticos de escisión para las RTs WT (NL4-3), T69A y  $\Delta$ 69. Las reacciones de escisión mediadas por foscarnet se llevaron a cabo con un complejo heteropolimérico que contenía un iniciador bloqueado con AZT (D38/5'- $^{32}$ P-25PGA<sup>AZT</sup>) (12,5 nM) (apartado 3.4.1) y la RT correspondiente (30 nM) en 30  $\mu$ l de tampón de preincubación [HEPES 50 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 15 mM, acetato magnésico 15 mM, acetato potásico 130 mM, DTT 1 mM y polietilenglicol 6000 al 5%]. La muestra fue incubada durante 10 min a 37 °C y las reacciones se

iniciaron mediante la adición de 10 µl de tampón de preincubación que contenía foscarnet a diferentes concentraciones (0 a 2,5 mM). Se tomaron alícuotas de 4 µl a diferentes tiempos (entre 0 y 7 h) y se agregaron a 12 µl de solución de parada [EDTA 10 mM en formamida al 90%, conteniendo xilencianol FF (3 mg/ml) y azul de bromofenol (3 mg/ml)]. Posteriormente, las muestras se incubaron a 90 °C durante 5 min. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% conteniendo urea 8 M. Los resultados se cuantificaron utilizando placas fotosensibles y un analizador de imagen *BAS1500* usando el programa Tina versión 2.09.

La escisión de producto ( $[P_{es}]$ ) frente al tiempo ( $t$ ) se ajustó a la ecuación exponencial:

$$[P_{es}] = A \times (1 - e^{-k_{obs} \times t})$$

donde  $A$  es la amplitud y  $k_{obs}$  es la tasa de escisión aparente. La dependencia de  $k_{obs}$  en función de la concentración de foscarnet está descrita por la ecuación hiperbólica:

$$k_{obs} = k_{es} \times [dNTP] / (K_d + [dNTP])$$

donde  $K_d$  y  $k_{es}$  son las constantes de disociación en equilibrio y de escisión del AZTMP en presencia de foscarnet para la RT, respectivamente, que se determinaron utilizando el programa SigmaPlot 2001. En este caso,  $k_{es}/K_d$ , se define como la eficiencia catalítica de escisión del análogo a nucleótido.

## **4.RESULTADOS**





## 4.1 Caracterización de RTs multirresistentes portadoras de la delección $\Delta 69$

Estudios anteriores han permitido identificar un aislado clínico en el que se detectó una delección de tres nucleótidos en el codón 69 de la región codificante de la RT, acompañada por una serie de mutaciones de resistencia a inhibidores análogos y no análogos a nucleósido. Ensayos fenotípicos revelaron que estos aislados eran resistentes a todos los inhibidores de la RT comercializados en 2007 (ver **Figura 16** en Introducción) (Villena *et al.*, 2007). La **Figura 21** muestra las variaciones de secuencia en el dominio polimerasa de la RT entre las variantes multirresistentes y la RT WT (NL4-3). Entre las mutaciones observadas se encuentra el complejo de la Q151M, constituido por los cambios A62V, V75I, F77L, F116Y y Q151M, que generan resistencia a múltiples NRTIs como AZT, ddI, ddC y d4T. También se encuentra la mutación M184V, responsable de generar niveles altos de resistencia al 3TC y FTC. Por otro lado, observamos mutaciones relacionadas con resistencia NNRTIs como K103N, Y181C y G190A, la primera de ellas implicada en resistencia a delavirdina, nevirapina y efavirenz.

|            | 39 | 41 | 62       | 67 | 68 | 69 | 70 | 75       | 77       | 101 | 102 | 103      | 115 | 116      | 123 | 135 | 151      | 162 | 163 | 167 | 177 | 181      | 184      | 190      | 202 | 211 | 215 | 219 |
|------------|----|----|----------|----|----|----|----|----------|----------|-----|-----|----------|-----|----------|-----|-----|----------|-----|-----|-----|-----|----------|----------|----------|-----|-----|-----|-----|
| WT (NL4-3) | T  | M  | A        | D  | S  | T  | K  | V        | F        | K   | Q   | K        | Y   | F        | D   | I   | Q        | C   | S   | I   | D   | Y        | M        | G        | I   | R   | T   | K   |
| MDR_69T    | A  | •  | <u>V</u> | •  | G  | •  | G  | <u>I</u> | <u>L</u> | R   | K   | <u>N</u> | F   | <u>Y</u> | E   | T   | <u>M</u> | S   | •   | V   | E   | <u>C</u> | <u>V</u> | <u>A</u> | V   | K   | •   | •   |
| MDR_T69A   | A  | •  | <u>V</u> | •  | G  | A  | G  | <u>I</u> | <u>L</u> | R   | K   | <u>N</u> | F   | <u>Y</u> | E   | T   | <u>M</u> | S   | •   | V   | E   | <u>C</u> | <u>V</u> | <u>A</u> | V   | K   | •   | •   |
| MDR_Δ69    | A  | •  | <u>V</u> | •  | G  | Δ  | G  | <u>I</u> | <u>L</u> | R   | K   | <u>N</u> | F   | <u>Y</u> | E   | T   | <u>M</u> | S   | •   | V   | E   | <u>C</u> | <u>V</u> | <u>A</u> | V   | K   | •   | •   |

**Figura 21.** Diferencias de aminoácidos en el dominio polimerasa de la RT entre variantes del VIH-1 obtenidas de un paciente portador de la delección  $\Delta 69$  y sometido a múltiples tratamientos y una RT de subtipo B no mutada (cepa NL4-3) (Villena *et al.*, 2007). Los residuos iguales a los encontrados en la enzima WT (NL4-3) se indican mediante puntos. Los aminoácidos subrayados son característicos de resistencia a inhibidores de la RT.

Dado que se dispone del seguimiento clínico del paciente del que se obtuvieron los aislados (ver **Figura 14** en Introducción), se decidió estudiar la contribución del tratamiento a la adquisición de multirresistencia y a la aparición de la delección  $\Delta 69$ . Para ello, se expresaron y purificaron RTs portadoras de la secuencia multirresistente del dominio polimerasa de la RT del paciente con: Thr en la posición 69 (MDR\_69T), con el cambio de aminoácido T69A (MDR\_T69A) y finalmente una variante portadora de la delección  $\Delta 69$  (MDR\_Δ69) (**Figura 21**). Nos planteamos averiguar cuál sería la ventaja selectiva que aportaría la delección ( $\Delta 69$ ) en un contexto de secuencia multirresistente y analizar el papel de la misma y sus mutaciones acompañantes en el mecanismo de resistencia a inhibidores de la RT.

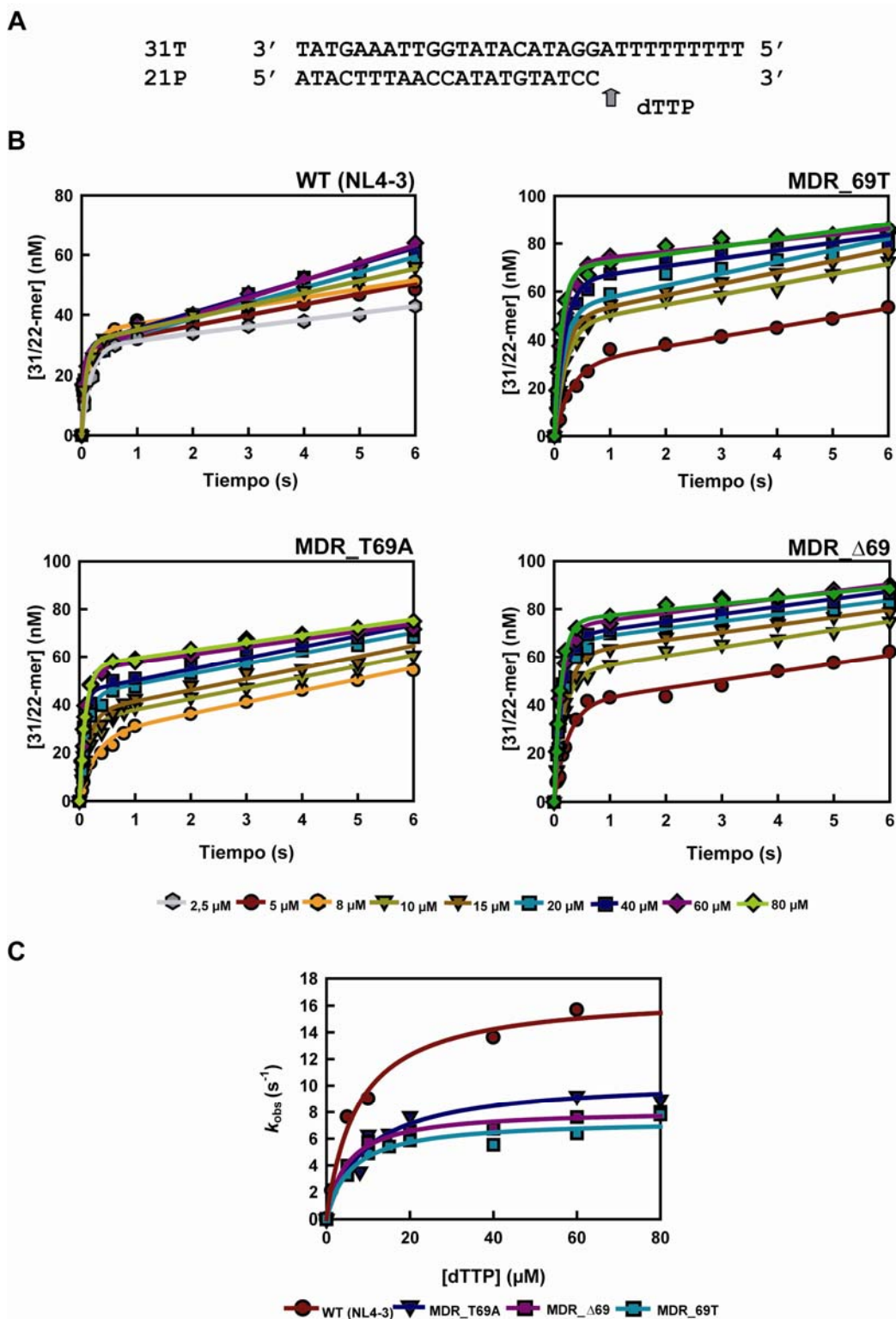
#### **4.1.1 Análisis de la actividad DNA polimerasa mediante ensayos de incorporación de dNTP en el estado pre-estacionario**

Los ensayos en el estado pre-estacionario permiten el análisis de la actividad enzimática en escalas de tiempo muy pequeñas ( $<1$  s), en las que tiene lugar la incorporación del dNTP. Los parámetros cinéticos determinados en el estado pre-estacionario permiten sacar conclusiones acerca del mecanismo de la reacción, al permitirnos determinar la constante de afinidad aparente para la unión del nucleótido entrante ( $K_d$ ) y la velocidad máxima de incorporación de éste ( $k_{pol}$ ).

Se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos en el estado pre-estacionario para las RTs WT (NL4-3) y las mutantes multirresistentes MDR\_69T, MDR\_T69A y MDR\_ $\Delta$ 69. En estos ensayos se utilizó el complejo molde-iniciador cuya secuencia se muestra en la **Figura 22A**. Las cinéticas de incorporación del nucleótido correcto (dTTP) sobre el complejo molde-iniciador 31T/21P para las enzimas multirresistentes estudiadas se muestran en la **Figura 22B**.

Con todas las variantes utilizadas se obtuvieron curvas exponenciales en las que se observa una primera fase de incorporación de dTTP rápida (“burst”) seguida de una segunda fase más lenta, cuya constante de velocidad es  $k_{ss}$  (**Figura 22B**). La velocidad de incorporación del nucleótido ( $k_{obs}$ ) se determinó en presencia de distintas concentraciones de dNTP. La dependencia de la velocidad de la reacción ( $k_{obs}$ ) con la concentración de nucleótido, se analizó ajustando los datos a una ecuación hiperbólica. Así, se obtuvo la velocidad máxima de incorporación del dNTP ( $k_{pol}$ ) y la constante de afinidad de unión del dNTP ( $K_d$ ) para las cuatro enzimas estudiadas (**Figura 22C**). En la **Tabla 5** se muestran los parámetros cinéticos obtenidos en el estado pre-estacionario.

A pesar de los cambios de aminoácido presentes en las RTs multirresistentes, que afectan a residuos localizados en el sitio de unión del dNTP (por ejemplo, Y115F, Q151M, M184V, etc.), éstas retienen una actividad polimerasa significativa. Los valores de  $K_d$  y  $k_{pol}$  para la incorporación del dTTP fueron similares para las tres enzimas, aunque la RT MDR\_ $\Delta$ 69 mostró un ligero aumento en su eficacia catalítica en comparación con el resto de mutantes. La RT C\_Q151M (portadora del complejo de la Q151M y caracterizada previamente en el laboratorio) tuvo una eficacia catalítica ( $k_{pol}/K_d$ ) para la incorporación de nucleótido similar a la del resto de mutantes, presentando valores entre 1,5 a 2,2 veces menores a los obtenidos con la enzima WT (NL4-3). Las diferencias observadas fueron debidas a una reducción en la constante catalítica de incorporación de dTTP ( $k_{pol}$ ), excepto en el caso de C\_Q151M (RT mutante portadora del complejo de la Q151M y



**Figura 22. Parámetros cinéticos para la incorporación del nucleótido correcto (dTTP) en el estado pre-estacionario.** (A) Secuencia del complejo molde-iniciador 31T/21P con el que se llevaron a cabo las cinéticas de incorporación. (B) Cinéticas de incorporación de dTTP sobre el complejo molde-iniciador 31T/21P en el estado pre-estacionario. A una mezcla preincubada con la RT (50 nM) y 31T/21P marcado con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5' (100 nM) se le añadieron concentraciones crecientes de nucleótido en un tampón que contenía  $\text{Mg}^{2+}$  a 12,5 mM. Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados y los productos se analizaron en geles de poliacrilamida y urea. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos a la ecuación  $[P] = A \times (1 - e^{-k_{\text{obs}} \times t}) + k_{\text{ss}} \times t$ . (C) Dependencia con de la incorporación de dTTP en el complejo molde-iniciador 31T/21P por la RT WT (NL4-3) y los mutantes analizados. Las velocidades de primer orden ( $k_{\text{obs}}$ ) obtenidas de los ajustes de los datos mostrados en (A) se representaron frente a la concentración de dTTP. (C) La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a la ecuación hiperbólica. Los datos se ajustaron a la ecuación  $k_{\text{obs}} = k_{\text{pol}} \times [\text{dNTP}] / (K_d + [\text{dNTP}])$ .

caracterizada previamente en el laboratorio), con la que se observó una pérdida de afinidad por el dTTP reflejada en una disminución de casi dos veces en la  $K_d$  aparente.

**Tabla 5. Parámetros cinéticos obtenidos en el estado pre-estacionario para la incorporación de dTTP en un complejo molde-iniciador heteropolimérico por parte de la RT WT (NL4-3) y las RTs multirresistentes.**

| Enzima               | Nucleótido | $k_{pol}$ (s <sup>-1</sup> ) | $K_d$ (μM) | $k_{pol}/K_d$ (μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) |
|----------------------|------------|------------------------------|------------|---|
| WT (NL4-3)           | dTTP       | 17,4 ± 2,0                   | 7,1 ± 2,5  | 2,47 ± 0,93                                       |
| MDR_69T              | dTTP       | 7,4 ± 0,4                    | 5,9 ± 1,7  | 1,25 ± 0,37                                       |
| MDR_Δ69              | dTTP       | 8,2 ± 0,3                    | 4,9 ± 0,8  | 1,65 ± 0,27                                       |
| MDR_T69A             | dTTP       | 10,5 ± 0,9                   | 9,4 ± 2,7  | 1,11 ± 0,33                                       |
| C_Q151M <sup>a</sup> | dTTP       | 14,1 ± 1,4                   | 13,3 ± 4,7 | 1,06 ± 0,39                                       |

Se utilizó el molde-iniciador 31T/21P como sustrato (Figura 22A). Los datos se muestran como el valor medio ± desviación estándar de un experimento representativo. Cada uno de los ensayos fue realizado al menos dos veces independientemente. La variabilidad entre los ensayos fue inferior al 20%.

<sup>a</sup> Los datos de la RT C\_Q151M, portadora del complejo de la Q151M (A62V/V75I/F77L/F116Y/Q151M) en un contexto de secuencia WT (NL4-3) fueron obtenidos previamente en el laboratorio (García-Pérez *et al.*, 2006; Matamoros *et al.*, 2009).

#### 4.1.2 Resistencia a AZT

Estudios anteriores han demostrado que la aparición de mutaciones del complejo de la Q151M (A62V/V75I/F77L/F116Y/Q151M) está asociada con resistencia a AZT (Deval *et al.*, 2002). Dado que las RTs multirresistentes son portadoras de este complejo, en este trabajo nos planteamos analizar su implicación en el mecanismo molecular de resistencia a AZT.

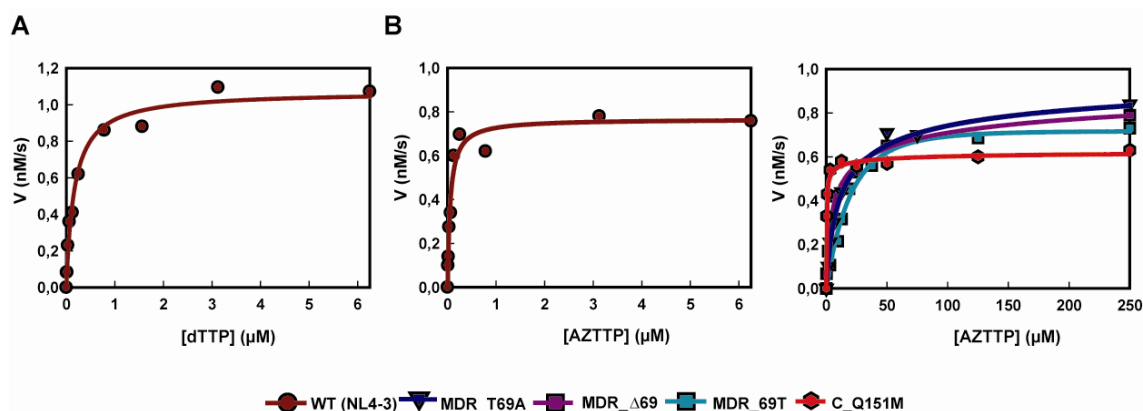
La resistencia a AZT puede darse a través de dos mecanismos moleculares diferentes, bien por discriminación en la incorporación entre los dNTPs naturales y los correspondientes análogos a nucleósido fosforilados, o mediante un incremento de la tasa de escisión de inhibidores terminadores de cadena en el extremo 3' del DNA sintetizado a través de un mecanismo de fosforolisis mediado por ATP o PPi (Mas *et al.*, 2002). Decidimos estudiar la influencia de ambos mecanismos en la resistencia al AZT y

determinar la capacidad que tienen las diferentes enzimas multirresistentes tanto para discriminar entre dTTP y AZT, como para escindir iniciadores bloqueados con AZT.

#### 4.1.2.1 Ensayos de incorporación de AZTTP

La incorporación de AZTTP en condiciones de estado pre-estacionario no fue posible, dado que se requerían concentraciones muy elevadas del inhibidor para observar incorporación a tiempos cortos, estimándose valores de  $K_d$  por encima de 40  $\mu\text{M}$  (datos no mostrados). Por ello, los ensayos de incorporación de AZTTP se realizaron en condiciones de estado estacionario. Este método no nos permite sacar conclusiones acerca del mecanismo de la reacción al no poder determinar de forma precisa las constantes de afinidad por el dNTP ( $K_d$  aparente) y la constante cinética de polimerización ( $k_{\text{pol}}$ ). Sin embargo, los datos obtenidos a partir de cinéticas en el estado estacionario permiten cuantificar la especificidad y eficiencia de la enzima y observar si existe una diferencia global en la incorporación del nucleótido para cada enzima. Mediante ensayos de incorporación de dNTP en el estado estacionario se obtienen las constantes catalítica ( $k_{\text{cat}}$ ) y de Michaelis-Menten aparente ( $K_m$ ), así como la eficacia catalítica de la enzima en el estado estacionario ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ).

Se llevaron a cabo ensayos de incorporación de nucleótido (dTTP y/o AZTTP) en el estado estacionario para la RT WT (NL4-3) y los mutantes C\_Q151M, MDR\_69A, MDR\_T69A y MDR\_Δ69 utilizando el complejo molde-iniciador 31T/21P. Las cinéticas de incorporación obtenidas para las enzimas estudiadas se muestran en la **Figura 23**.



**Figura 23. Dependencia de la concentración de nucleótido, para la incorporación de dTTP y AZTTP en el complejo molde-iniciador 31T/21P en condiciones de estado estacionario.** (A) Velocidad de incorporación de dNTP por parte de la RT WT (NL4-3) en presencia de concentraciones crecientes de nucleótido. (B) Velocidad de incorporación de la RT WT (NL4-3) y los mutantes C\_Q151M, MDR\_69T, MDR\_T69A y MDR\_Δ69 en presencia de concentraciones crecientes de inhibidor. La velocidad de formación de producto se determinó a 10-12 concentraciones diferentes de AZTTP o dTTP, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.6.2 de Materiales y Métodos. Las tasas de formación de producto obtenidas a las distintas concentraciones de dNTPs, se ajustaron a la ecuación hiperbólica de Michaelis-Menten, y la velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ ) y constante de Michaelis aparente ( $K_m$ ) se determinaron para cada enzima y nucleótido de la reacción. La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a la ecuación hiperbólica.

Las cinéticas de incorporación de dTTP y AZTTP obtenidas con la RT WT (NL4-3) fueron similares (**Figura 23**). La RT WT (NL4-3) incorpora mucho más eficazmente el AZTTP que las RTs mutantes MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_Δ69 y C\_Q151M, ya que éstas requieren una concentración mayor de AZTTP para alcanzar la velocidad máxima ( $V_{\max}$ ) (**Figura 23**).

La **Tabla 6** muestra los parámetros cinéticos obtenidos para las enzimas estudiadas. La eficacia catalítica observada para la enzima WT (NL4-3) en incorporación de dTTP fue similar a la obtenida con AZTTP. Cuando se compararon los parámetros cinéticos para la incorporación de dTTP y AZTTP por la RT WT (NL4-3) se observó una leve disminución de menos de 2 veces y de 2,6 veces en la  $k_{\text{cat}}$  y  $K_m$ , respectivamente. Esto da lugar a una eficacia catalítica sólo 1,5 veces más alta para el AZTTP que para el dTTP.

**Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos en el estado estacionario para la incorporación de dTTP y AZTTP por la RT WT (NL4-3) y RTs mutantes portadoras de combinaciones de mutaciones que confieren multirresistencia.**

| Enzima     | Nucleótido | $k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | $K_m$ ( $\mu\text{M}$ ) | $k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) |
|------------|------------|--|-------------------------|---|
| WT (NL4-3) | dTTP       | $2,30 \pm 0,09$                        | $0,129 \pm 0,017$       | $17,8 \pm 2,5$  |
|            | AZTTP      | $1,32 \pm 0,09$                        | $0,048 \pm 0,012$       | $27,5 \pm 7,1$  |
| MDR_69T    | AZTTP      | $2,19 \pm 0,10$                        | $17,2 \pm 3,8$          | $0,13 \pm 0,03$   |
| MDR_Δ69    | AZTTP      | $1,65 \pm 0,13$                        | $6,7 \pm 2,1$           | $0,25 \pm 0,08$   |
| MDR_69A    | AZTTP      | $2,12 \pm 0,09$                        | $11,0 \pm 1,9$          | $0,19 \pm 0,03$   |
| C_Q151M    | AZTTP      | $1,12 \pm 0,03$                        | $0,36 \pm 0,05$         | $3,11 \pm 0,45$   |

Después de la formación del complejo de RT • (DNA/DNA), las reacciones de incorporación de dTTP se incubaron a 37 °C durante 10, 20, 30 y 40 s, para determinar la tasa de formación de producto en el estado estacionario a cada concentración de nucleótido. El complejo molde-iniciador utilizado fue 31T/21P. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo, obtenidos del ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten. La  $k_{\text{cat}}$  (constante catalítica) se determinó en base a la relación entre  $V_{\max}$  y la concentración de enzima activa en el ensayo. Cada experimento se realizó al menos tres veces independientemente. La variabilidad entre los distintos ensayos fue inferior al 20%.

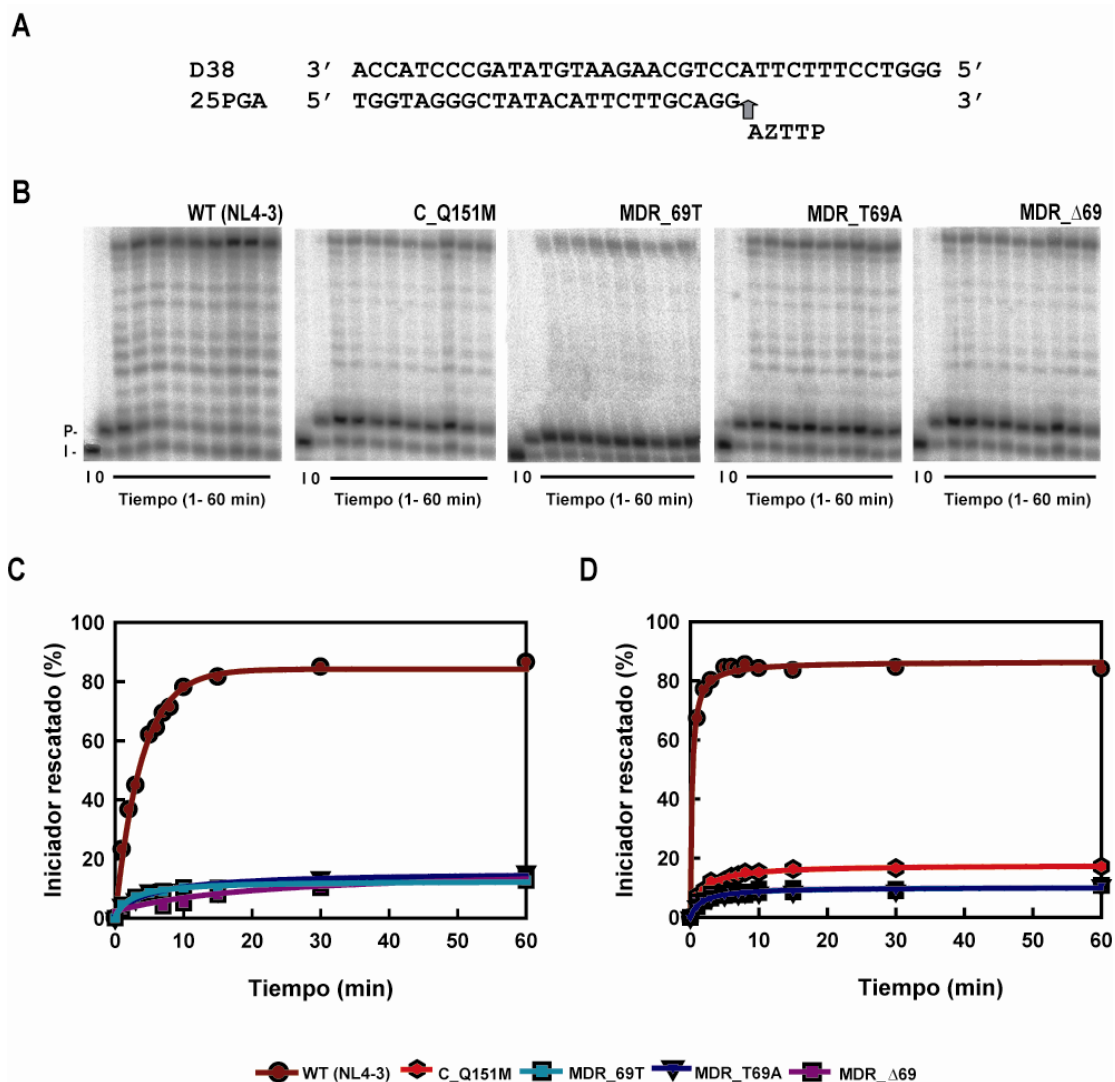
En estos ensayos no detectamos diferencias importantes entre los valores de  $k_{\text{cat}}$  y  $K_m$  para la incorporación de AZTTP, obtenidos con las enzimas MDR\_69T y MDR\_T69A, aunque se observó un ligero aumento en la eficacia catalítica ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) en reacciones llevadas a cabo con la RT MDR\_Δ69. Sin embargo, los mutantes

multirresistentes muestran un descenso de 110 a 211 veces de la eficacia catalítica respecto a la de la enzima WT (NL4-3) para la incorporación del inhibidor. La disminución de la eficacia catalítica observada con las RTs multirresistentes fue debida al aumento, entre 140 y 358 veces, de los valores de  $K_m$  para el AZTTP en relación con los de la RT WT (NL4-3). Por otro lado, observamos que el mutante C\_Q151M tiene una eficacia catalítica 8,8 veces más baja en comparación a la enzima WT (NL4-3) para la incorporación de AZTTP, debida también a un aumento en los valores de su  $K_m$  de 7,5 veces. Estos resultados nos indican que las enzimas mutantes multirresistentes MDR\_69T, MDR\_T69A y MDR\_Δ69 incorporan muy mal el inhibidor y que gran parte de esa baja incorporación se debe a la presencia de las mutaciones del complejo de la Q151M.

#### **4.1.2.2 Escisión de AZT-monofosfato (AZTMP) de iniciadores de DNA bloqueados**

Con el fin de determinar si existen diferencias en las cinéticas de escisión de iniciadores bloqueados con AZTMP, debido a los cambios en la posición 69 o al contexto de secuencia de las RTs mutantes, se analizó la capacidad de escisión de AZTMP mediada por PPi de la RT WT (NL4-3) y los mutantes MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_Δ69 y C\_Q151M. La capacidad de estas RTs para rescatar iniciadores terminados con AZTMP se analizó utilizando el complejo molde-iniciador D38/25PGA (**Figura 24A**). Estos experimentos se llevaron a cabo en dos etapas. En primer lugar, se incubó la enzima con el molde-iniciador en presencia de AZTTP, produciéndose la incorporación de éste y el bloqueo del iniciador. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de desbloqueo y elongación, mediante la adición de una mezcla de dNTPs y de un donador de PPi (**Figura 24B**).

Se analizó la actividad fosforolítica en presencia de PPi 20  $\mu$ M y/o 400  $\mu$ M con la RT WT (NL4-3) y los mutantes MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_Δ69 y C\_Q151M. Los resultados de las cinéticas de rescate se muestran en la **Figura 24C,D**. Las enzimas multirresistentes presentaron muy baja actividad fosforolítica en presencia de PPi 20  $\mu$ M y 400  $\mu$ M, observándose rescates inferiores al 20% para todos los mutantes, frente al 80% detectado con la enzima WT (NL4-3) en ambos casos. Estos resultados son consistentes con la baja eficacia catalítica para la incorporación de AZTTP observada anteriormente. La RT portadora de mutaciones del complejo de la Q151M, tampoco presentó actividad fosforolítica significativa en presencia de PPi a 400  $\mu$ M (rescatando menos del 20% del iniciador bloqueado). Estos datos sugieren que la baja actividad fosforolítica de las enzimas multirresistentes podría deberse a la presencia de una o más mutaciones del complejo de la Q151M.



**Figura 24. Reacciones de escisión de iniciadores bloqueados con AZTTP en presencia de PPi con la RT WT (NL4-3) y los mutantes C\_Q151M, MDR\_69T, MDR\_T69A y MDR\_Δ69.** (A) Molde-iniciador heteropolimérico D38/25PGA utilizado en las reacciones de rescate. (B) Reacciones de rescate realizadas en presencia de 400  $\mu$ M PPi con la enzima WT (NL4-3) y las RTs mutantes C\_Q151M, MDR\_69T, MDR\_T69A y MDR\_Δ69. En primer lugar, el AZTTP fue incorporado en el iniciador (I) (pocillo I) en la posición +1, para generar un producto (P) (pocillo 0) de 26 nucleótidos. La escisión del AZTTP y posterior extensión del iniciador se hizo en presencia de PPi 400  $\mu$ M y una mezcla de dNTPs (dCTP, dGTP y dTTP, a 100  $\mu$ M cada uno y dATP a 1  $\mu$ M). Se retiraron alícuotas al cabo de 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 30 y 60 min, después de añadir PPi. (C) Cinéticas de las reacciones de rescate catalizadas por la enzima WT (NL4-3) y los mutantes MDR\_69T, MDR\_T69A y MDR\_Δ69 en presencia de PPi 20  $\mu$ M (D) Cinéticas de las reacciones de rescate catalizadas por la enzima WT (NL4-3) y los mutantes MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_Δ69 y C\_Q151M en presencia de PPi 400  $\mu$ M. La concentración de molde-iniciador (D38/25PGA) y enzima activa en estos ensayos fue de 30 y 24 nM, respectivamente. La concentración de AZTTP en la reacción de bloqueo fue de 50  $\mu$ M. Los valores representados se obtuvieron de 3 experimentos independientes. En estos ensayos, las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que la sustitución de Val75 por Ile (V75I), mutación accesoria del complejo de la Q151M, disminuye la escisión de análogos a timidina (d4TMP y AZTTP) en distintos contextos de secuencia (Matamoros *et al.*, 2009). Dado que las enzimas mutantes analizadas en este trabajo presentan la mutación V75I, quisimos comprobar si la baja actividad fosforolítica observada venía dada por la presencia del cambio V75I. Para ello, se sustituyó Ile75 por



Val en la RT mutante MDR\_ $\Delta$ 69, dando lugar a la RT MDR\_ $\Delta$ 69/I75V (**Figura 17**). Los ensayos de fosforólisis en presencia de PPi 400  $\mu$ M no revelaron diferencias significativas entre MDR\_ $\Delta$ 69 y MDR\_ $\Delta$ 69/I75V (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que, además de la mutación V75I, otras sustituciones presentes en la secuencia de la RT de las enzimas multirresistentes están implicadas en la baja actividad fosforolítica observada.

#### 4.1.3 Resistencia a NNRTIs

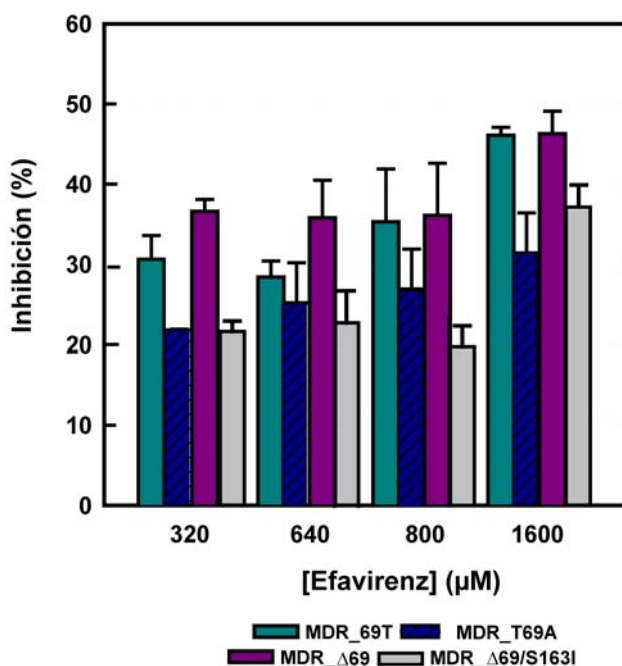
Estudios previos demostraron que las variantes del VIH-1 portadoras de las RTs multirresistentes descritas en la **Figura 21** eran resistentes a los NNRTIs nevirapina, delavirdina y efavirenz (ver **Figura 16** en Introducción) (Villena *et al.*, 2007). La secuencia de la RT de las enzimas multirresistentes, contiene mutaciones características de resistencia a NNRTIs como por ejemplo K103N, Y181C y G190A. Sabemos que K103N confiere resistencia a todos los NNRTIs utilizados en clínica excepto etravirina. El paciente portador de RTs multirresistentes recibió efavirenz en al menos dos ocasiones durante su tratamiento, lo que probablemente permitió la selección de K103N como mutación de resistencia. Estudiamos el papel de este cambio de aminoácido en la resistencia a distintos NNRTIs, incluido el efavirenz.

##### 4.1.3.1 Determinación de la $CI_{50}$ para efavirenz de las enzimas multirresistentes

Se determinó la  $CI_{50}$  del efavirenz para la RT WT (NL4-3) y para las RTs mutantes MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_ $\Delta$ 69 y MDR\_ $\Delta$ 69/S163I. La variante MDR\_ $\Delta$ 69/S163I se caracteriza por llevar la mutación S163I, que en el paciente aparece siempre acompañando a la delección  $\Delta$ 69 y que se ha observado que aumenta la eficacia biológica de las variantes del virus que llevan la delección (Villena *et al.*, 2007). Se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA y se midió la inhibición producida por el efavirenz durante la incorporación de un nucleótido en el extremo 3' del iniciador. Los resultados se muestran en la **Figura 25**.

Todos los mutantes estudiados fueron muy resistentes al efavirenz, con  $CI_{50}$ s superiores a 1,6 mM. No obstante, los mutantes MDR\_T69A y MDR\_ $\Delta$ 69/S163I son algo más resistentes al efavirenz que las otras dos RTs mutantes (MDR\_69T y MDR\_ $\Delta$ 69), mostrando diferencias significativas en su susceptibilidad al inhibidor a concentraciones de efavirenz de 320  $\mu$ M y 1,6 mM ( $p < 0,05$ , de acuerdo a la prueba t de Student). En estos ensayos, la presencia o ausencia de la delección no parece estar afectando a la sensibilidad al efavirenz. Por el contrario, la mutación S163I sí parece cambiar el perfil de

resistencia, disminuyendo ligeramente la susceptibilidad a efavirenz del mutante MDR\_Δ69.

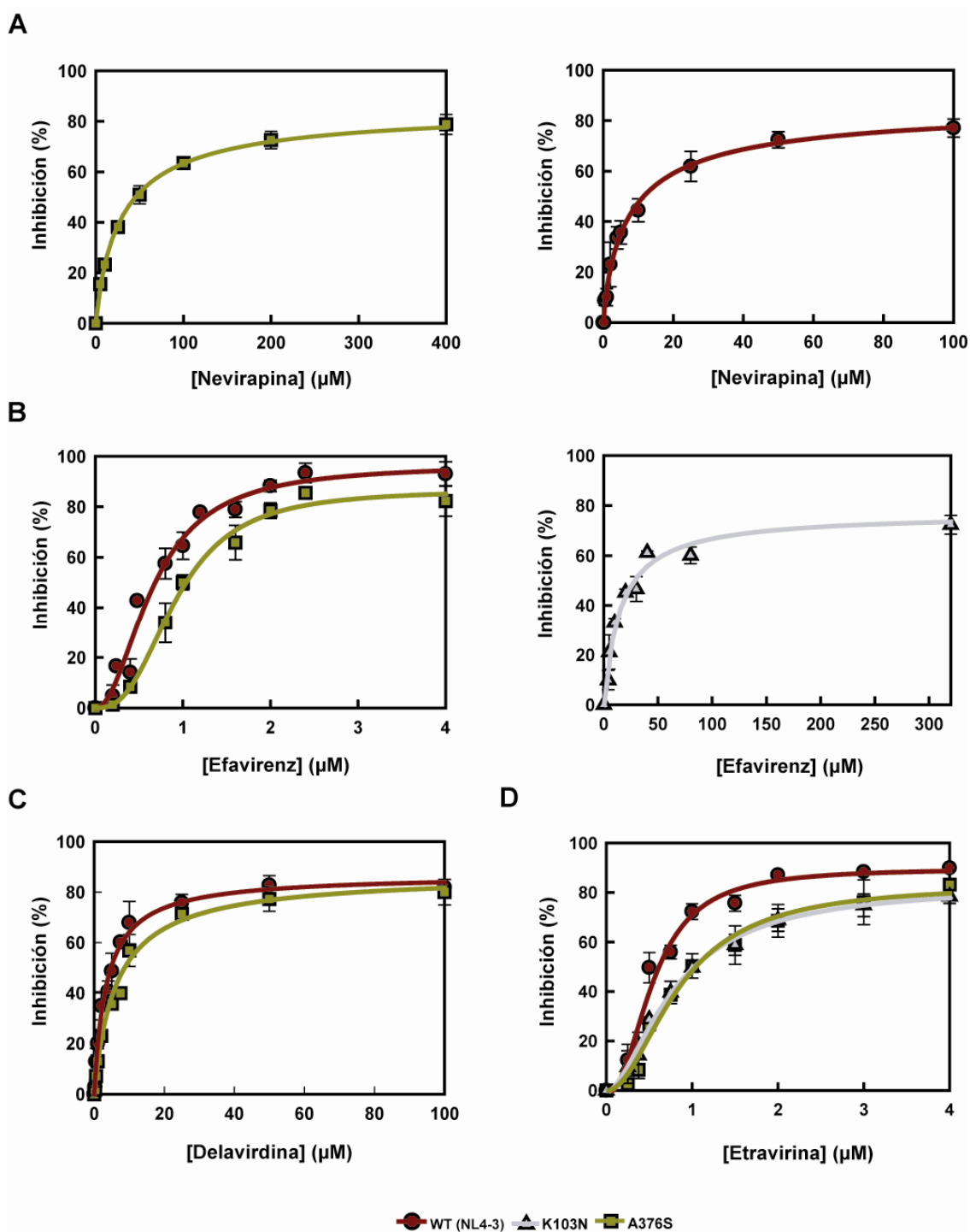


**Figura 25.** Histogramas mostrando la inhibición de las RTs mutantes MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_Δ69 y MDR\_Δ69/S163I en presencia de distintas concentraciones de efavirenz. Los datos mostrados se obtuvieron de 3 a 6 experimentos y se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. La concentración de enzima y de complejo molde-iniciador en todos los ensayos fue de 12-20 nM y 30 nM, respectivamente.

#### 4.1.3.2 Contribución de K103N a la resistencia a NNRTIs

Se estudió el efecto de la mutación K103N sobre la resistencia a NNRTIs en un contexto de secuencia WT (NL4-3). Para ello, se determinó la  $CI_{50}$  para la RT WT (NL4-3) y para el mutante K103N con los NNRTIs nevirapina, delavirdina, efavirenz y etravirina. Como control se realizaron ensayos de inhibición con una RT portadora del cambio de Ala por Ser en la posición 376 del subdominio “connection” (A376S) y que se ha vinculado recientemente con resistencia a nevirapina (Hachiya *et al.*, 2009). Los resultados se muestran en la **Figura 26** y en la **Tabla 7**.

Los NNRTIs efavirenz y etravirina son los inhibidores más potentes para la RT WT (NL4-3), mientras que la nevirapina sería el menos efectivo, con valores de  $CI_{50}$  superiores a los del resto de los inhibidores ensayados. Por otro lado, la etravirina es el inhibidor más potente en todos los casos, con valores de  $CI_{50}$  bajos o muy bajos para las tres enzimas estudiadas (**Tabla 7**). Los ensayos de  $CI_{50}$  realizados con el mutante A376S demuestran que la sustitución de Ala por Ser produce un aumento de menos de 2 veces en la  $CI_{50}$  para todos los inhibidores ensayados, excepto nevirapina, para el que la sustitución A376S produjo un aumento en la  $CI_{50}$  de 4 veces aproximadamente (**Figura 26** y **Tabla 7**).



**Figura 26. Inhibición de las RTs WT (NL4-3), K103N y A376S por (A) nevirapina, (B) efavirenz, (C) delavirdina y (D) etravirina.** La concentración final de enzima y complejo molde-iniciador D38/25PGA en los ensayos fue de 12-20 nM y 30 nM, respectivamente. Después de incubar el complejo RT•D38/25PGA con diferentes concentraciones del NNRTI correspondiente, se inició la reacción de polimerización mediante la adición de tampón de reacción que contenía dTTP a una concentración final de 25  $\mu$ M y DMSO al 1%. El tiempo de incubación utilizado fue de 20 s y se encontraba dentro del rango lineal de la cinética de incorporación de nucleótido correspondiente.

**Tabla 7. Inhibición por NNRTIs de la RT WT (NL4-3) y de los mutantes K103N y A376S.**

| Enzima            | CI <sub>50</sub> (μM) |             |             |             |
|-------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
|                   | Nevirapina            | Delavirdina | Efavirenz   | Etravirina  |
| <b>WT (NL4-3)</b> | 12,2 ± 4,2            | 4,8 ± 0,5   | 0,72 ± 0,09 | 0,56 ± 0,11 |
| <b>K103N</b>      | > 1600                | > 1600      | 26,6 ± 1,6  | 1,02 ± 0,09 |
| <b>A376S</b>      | 45,9 ± 7,8            | 8,4 ± 1,2   | 1,03 ± 0,02 | 1,06 ± 0,12 |

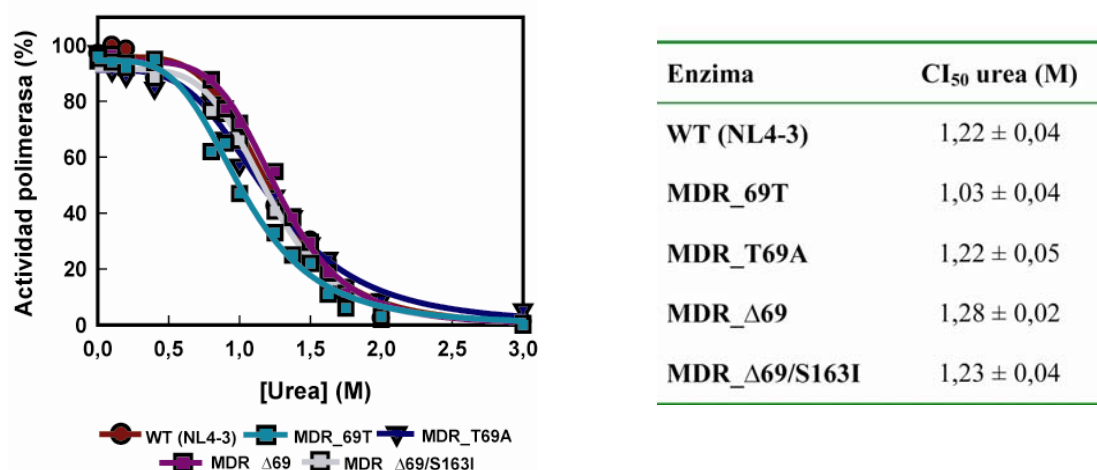
Los datos mostrados se obtuvieron de 3 a 6 experimentos y se expresan como media ± desviación estándar.

El mutante K103N resultó ser muy resistente a nevirapina y delavirdina con CI<sub>50</sub>s superiores a 1,6 mM para ambos fármacos, siendo este valor más de 133 y 400 veces superior al observado con la RT WT (NL4-3). La RT K103N también presentaba niveles altos de resistencia a efavirenz con una CI<sub>50</sub> 37 veces mayor a la obtenida con la RT WT (NL4-3). Sin embargo, K103N no es el único cambio de aminoácido responsable de la resistencia a efavirenz de las enzimas multirresistentes, dado que los valores obtenidos de CI<sub>50</sub> para estas enzimas fueron superiores a 1,6 mM y por tanto, 50 veces más altos que los valores obtenidos con K103N.

#### **4.1.3.3 Estabilidad del heterodímero en RTs multirresistentes y efecto de K103N sobre la interacción de la enzima con el complejo molde-iniciador**

Estudios previos han demostrado que el efavirenz potencia significativamente las interacciones entre las subunidades p66 y p51 de la RT del VIH-1, estabilizando su estructura heterodimérica (Tachedjian *et al.*, 2001; Tachedjian y Goff, 2003). También, se ha observado que la mutación K103N incrementa la estabilidad del heterodímero (Figueiredo *et al.*, 2008). El seguimiento del paciente portador de la delección Δ69, reveló que la cantidad relativa de Δ69 aumentaba de un 5% a un 50% cuando el paciente recibía efavirenz con el tratamiento (Villena *et al.*, 2007). Dado que Δ69 no ejerce ningún efecto sobre la sensibilidad al efavirenz, consideramos la posibilidad de que el efavirenz estuviera jugando un papel importante en la dimerización y estabilización del heterodímero de la RT portadora de la delección. Para ello, estudiamos la estabilidad de las RTs en presencia de urea, utilizando el complejo molde-iniciador D38/25PGA (**Figura 24A**). El tratamiento de la RT con urea puede resultar en una pérdida completa de la actividad enzimática como consecuencia de la disociación de las subunidades del heterodímero p66 y p51 o de la pérdida de interacciones entre la RT y el complejo molde-iniciador, y por ello se utilizó como medida de estabilidad de la RT.

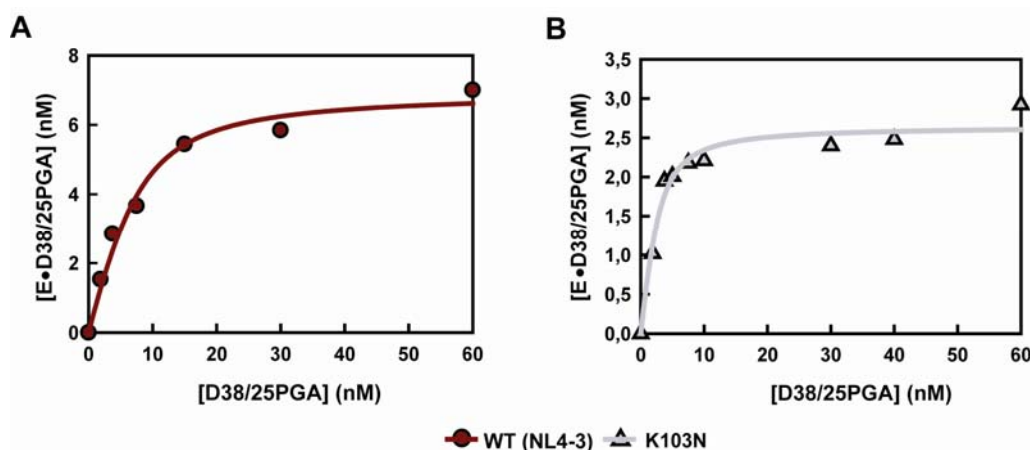
Las enzimas estudiadas fueron WT (NL4-3), MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_Δ69 y MDR\_Δ69/S163I y se determinó la concentración de urea en la que el 50% de la enzima se encontraba inactivada ( $CI_{50}$ ) (**Figura 27**). En estos estudios no se apreciaron diferencias importantes entre los valores obtenidos para las enzimas mutantes con respecto a la enzima WT (NL4-3), aunque la enzima mutante MDR\_69T fue un 20% más sensible a la urea que las otras RTs estudiadas.



**Figura 27.** Efecto de la urea sobre la actividad DNA polimerasa de las RTs WT (NL4-3), MDR\_69T, MDR\_T69A, MDR\_Δ69 y MDR\_Δ69/S163I. Se preincubó la RT en tampón de reacción que contenía diferentes concentraciones de urea. La reacción de polimerización se inició mediante la adición de complejo molde-iniciador D38/25PGA y dTTP. La relación entre porcentaje de iniciador elongado frente a la concentración de urea y el porcentaje de iniciador elongado en ausencia del agente desnaturante se utilizó para determinar la actividad polimerasa de la RT. Mediante el ajuste de los datos a una ecuación logística, se determinó la concentración de urea que inhibía la actividad de la RT al 50%. La concentración de RT utilizada fue de 30-50 nM y la de D38/25PGA fue 30 nM. Se realizaron de 3 a 6 experimentos y se obtuvieron los valores de  $CI_{50}$  mostrados en la tabla a la derecha.

La afinidad de la enzima por el DNA es un factor que influye en la estabilidad del heterodímero de la RT. Dado que la pérdida de estabilidad en presencia de urea puede deberse tanto a la disociación de las subunidades p66/p51 como a la pérdida de afinidad por el complejo molde-iniciador, y dado que la mutación K103N incrementa la estabilidad del heterodímero (Figueiredo *et al.*, 2008), decidimos estudiar el efecto de K103N sobre la interacción de la RT con el DNA. Para ello, se determinaron las constantes de equilibrio de disociación de la RT y el DNA con las enzimas WT (NL4-3) y el mutante K103N, utilizando el complejo molde-iniciador D38/25PGA.

El mutante K103N tiene 3 veces mayor afinidad por el complejo molde-iniciador D38/25PGA que la RT WT (NL4-3), obteniéndose valores de  $K_d$  de  $3,07 \pm 0,71$  nM para la RT WT (NL4-3) y  $1,00 \pm 0,28$  nM para K103N (**Figura 28**). Estos resultados indican que la mutación K103N incrementa la afinidad de la enzima por el DNA y probablemente influye en la estabilidad del heterodímero de la RT.

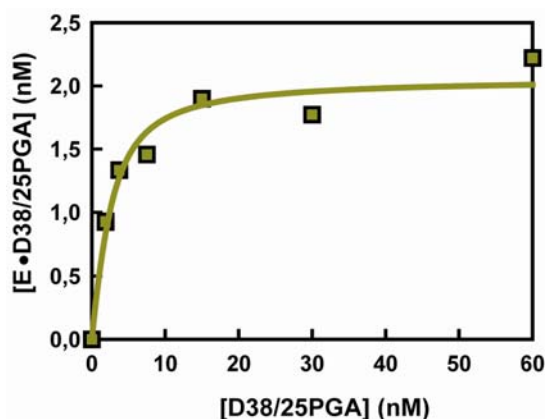


**Figura 28. Afinidad de la RT WT NL4-3 (A) y la RT mutante K103N (B) por el complejo heteropolimérico DNA/DNA.** Después de preincubar la RT (de 2 a 8 nM) con diferentes concentraciones de complejo molde-iniciador D38/25PGA (de 1,875 a 60 nM), se inició la reacción mediante la adición de tampón de reacción que contenía dTTP y DMSO al 1%. Se retiraron alícuotas a los 10, 20, 30 y 40 s y se determinó el porcentaje de molde-iniciador unido a la RT a tiempo cero. La concentración de enzima activa unida al complejo molde-iniciador, a diferentes concentraciones del mismo se ajustó a la ecuación:  $[E \cdot DNA] = 0,5 \times [(K_d + E_T + TP) - \sqrt{(K_d + E_T + TP)^2 - (4 \times E_T \times TP)}]$ , para determinar la constante de equilibrio de disociación de la RT por el DNA ( $K_d$ ). Las gráficas muestran el mejor ajuste de un experimento representativo. Se realizaron de 3 a 6 experimentos independientes y los valores medios de  $K_d$  obtenidos fueron:  $3,07 \pm 0,71$  nM para la RT WT (NL4-3) y  $1,00 \pm 0,28$  nM para K103N.

#### 4.1.3.4 Papel de A376S en la resistencia a nevirapina

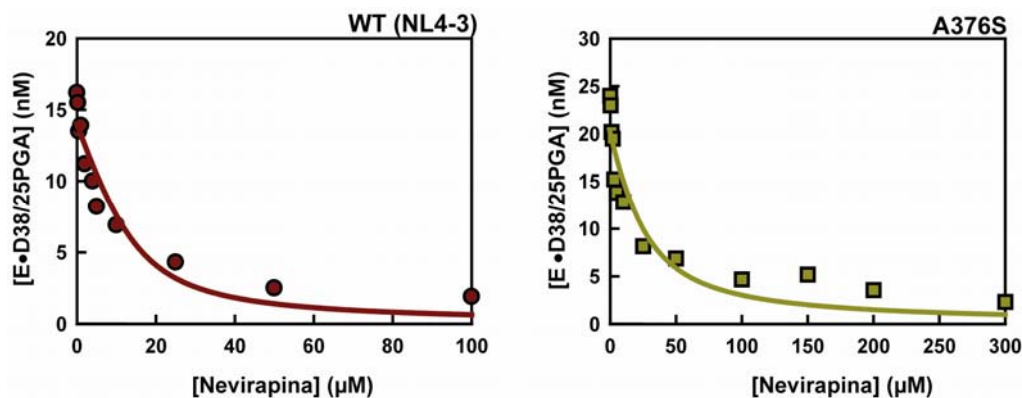
Es interesante destacar que en las RTs multirresistentes estudiadas, los residuos 248-560 (pertenecientes al subdominio “connection” y al dominio RNasa H de la RT del VIH-1) contienen la secuencia de la RT WT (NL4-3). Sin embargo, estudios de capacidad replicativa revelaron que los clones virales que llevaban los residuos 248-527 del paciente replicaban más eficientemente que los que contenían la secuencia WT (NL4-3) en estas posiciones (Villena *et al.*, 2007). Estas observaciones sugieren que mutaciones del subdominio “connection” y del dominio RNasa H, en combinación con mutaciones del dominio polimerasa de la RT estarían jugando un papel importante en la capacidad replicativa del virus.

Por todo ello, y en vista de los resultados obtenidos en los ensayos de  $CI_{50}$  realizados para la RT mutante A376S donde observamos que la mutación A376S producía un incremento de 4 veces en la  $CI_{50}$  para nevirapina, decidimos estudiar el papel de la mutación A376S en el mecanismo de resistencia a nevirapina. Analizamos en primer lugar la afinidad del mutante A376S por el DNA. Al igual que sucedía con el mutante K103N, la RT portadora del cambio A376S presentó una mayor afinidad por el DNA que la RT WT (NL4-3) (Figura 29). Así, la  $K_d$  obtenida con la RT A376S fue  $1,63 \pm 0,29$  nM, aproximadamente dos veces inferior a la de la RT WT (NL4-3) (Figura 29).



**Figura 29. Afinidad de la RT mutante A376S por el complejo heteropolimérico de DNA/DNA.** Después de preincubar la RT (de 2 a 8 nM) con diferentes concentraciones de complejo molde-iniciador D38/25PGA (de 1,875 a 60 nM), se inició la reacción mediante la adición de tampón de reacción que contenía dTTP y DMSO al 1%. Se retiraron alícuotas a los 10, 20, 30 y 40 s y se determinó el porcentaje de molde-iniciador unido a la RT a tiempo cero. La concentración de enzima activa unida al complejo molde-iniciador a diferentes concentraciones del mismo se ajustó a la ecuación:  $[E \cdot DNA] = 0,5 \times [(K_d + E_T + TP) - \sqrt{(K_d + E_T + TP)^2 - (4 \times E_T \times TP)}]$ , para determinar la constante de equilibrio de disociación de la RT por el DNA ( $K_d$ ). Las gráficas muestran el mejor ajuste de un experimento representativo. Se realizaron de 3 a 6 experimentos independientes y el valor de  $K_d$  obtenido fue  $1,63 \pm 0,29$  nM.

Posteriormente, determinamos la constante de equilibrio de disociación de nevirapina para la RT WT (NL4-3) y el mutante A376S. Para ello, se obtuvo la concentración de RT unida al complejo molde-iniciador D38/25PGA a diferentes concentraciones de nevirapina. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 30**.



**Figura 30. Determinación de la constante de afinidad por nevirapina para de las RTs WT (NL4-3) y el mutante A376S.** La concentración final de enzima y de complejo molde iniciador D38/25PGA en el ensayo fue 30 nM. Después de preincubar el complejo RT/molde-iniciador con diferentes concentraciones de nevirapina (de 0 a 300 μM), se inició la reacción mediante la adición de tampón de reacción que contenía dTTP y DMSO al 1%. Se retiraron alícuotas a los 10, 20, 30 y 40 s y se determinó el porcentaje de molde-iniciador unido a la RT a tiempo cero. La concentración de enzima unida al complejo molde-iniciador a diferentes concentraciones de nevirapina se ajustó a la ecuación  $[E \cdot DNA] = E_T - 0,5 \times [(K_d + E_T + I) - \sqrt{(K_d + E_T + I)^2 - (4 \times E_T \times I)}]$  para determinar la constante de equilibrio de disociación de la RT con el inhibidor ( $K_d$ ). Se realizaron de 3 a 6 experimentos independientes y los valores de  $K_d$  obtenidos fueron:  $5,88 \pm 1,12$  μM para la RT WT (NL4-3) y  $16,64 \pm 3,43$  μM para A376S.

La  $K_d$  obtenida para la RT WT (NL4-3) fue de  $5,88 \pm 1,12$  μM mientras que el valor obtenido para el mutante A376S fue 3 veces mayor ( $16,64 \pm 3,43$  μM), lo que sugiere una reducción de la afinidad de la enzima por el inhibidor.

## 4.2 Papel de la delección $\Delta 69$ en el mecanismo molecular de resistencia a NRTIs

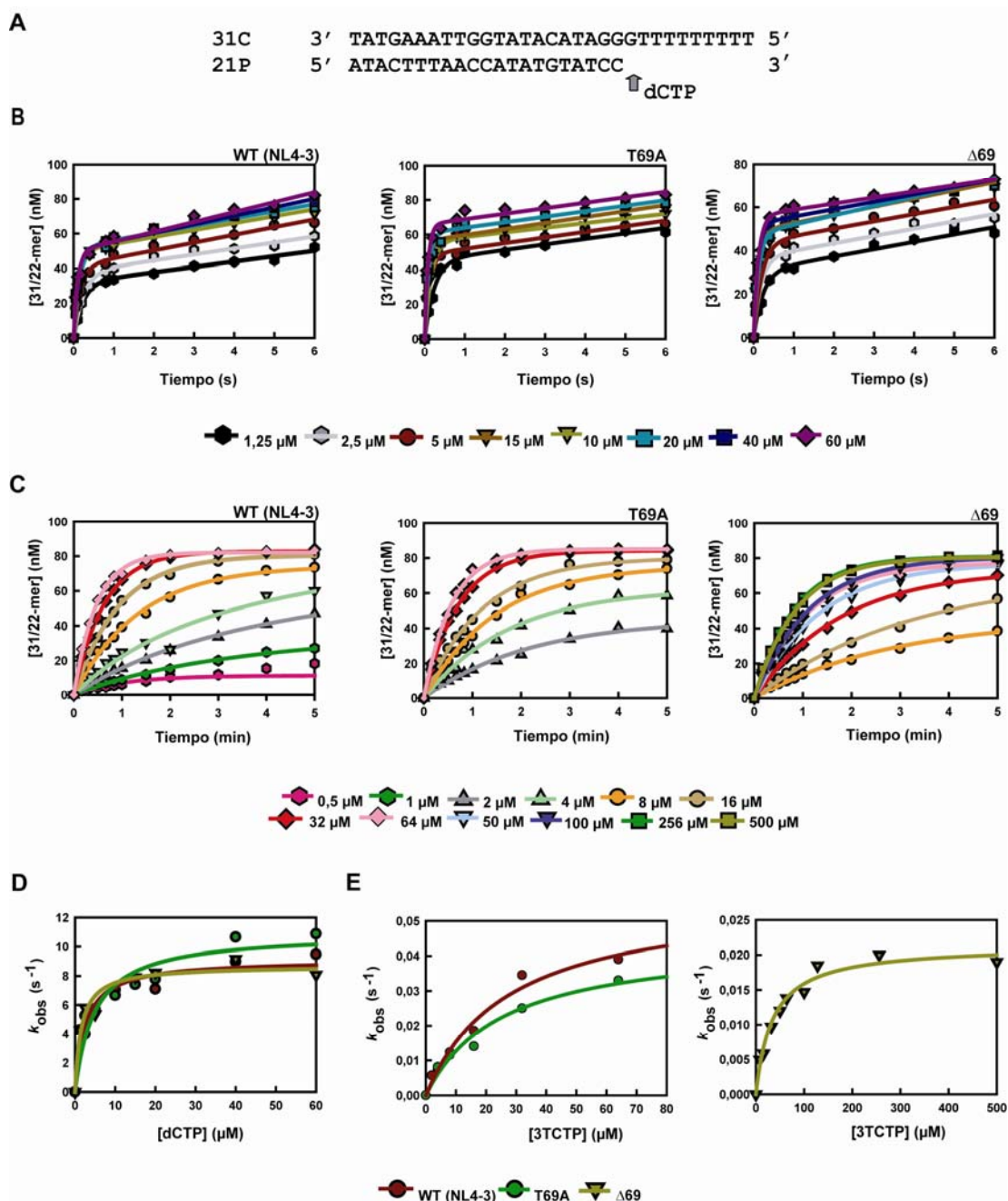
El cambio más significativo que aparece en la RT de las variantes multirresistentes estudiadas es la delección del codón 69 ( $\Delta 69$ ) que codifica para Thr, en la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  de la RT. En ensayos fenotípicos se observó que, por sí sola,  $\Delta 69$  confiere bajos niveles de resistencia a 3TC y FTC e hipersensibilidad a AZT (Villena *et al.*, 2007). Al objeto de determinar los mecanismos moleculares responsables de los bajos niveles de resistencia a 3TC/FTC y de la hipersensibilidad al AZT, se llevaron a cabo ensayos cinéticos en el estado pre-estacionario y ensayos de escisión en presencia de ATP y PPi con distintas RTs portadoras y no portadoras de la delección.

### 4.2.1 Papel de la delección $\Delta 69$ en resistencia a 3TC

#### 4.2.1.1 Discriminación entre dCTP y 3TCTP analizada mediante ensayos cinéticos de incorporación de nucleótido en el estado pre-estacionario

Se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos para la incorporación de dTTP y 3TCTP en el estado pre-estacionario con la RT WT (NL4-3) y con los mutantes  $\Delta 69$  y T69A. En estos ensayos se utilizó el complejo molde-iniciador 31C/21P, cuya secuencia se muestra en la **Figura 31A**. Las cinéticas de incorporación del nucleótido correcto (dCTP) y del análogo a nucleótido (3TCTP) en el complejo 31C/21P para las enzimas estudiadas se muestran en la **Figura 31B,C**. La constante catalítica de incorporación del nucleótido ( $k_{\text{obs}}$ ) se determinó a distintas concentraciones de dNTP. La incorporación de dCTP en todos los casos es mucho más rápida que la del 3TCTP (**Figura 31B,C**). Las constantes de velocidad ( $k_{\text{obs}}$ ) para el 3TCTP se determinaron bajo condiciones de “single turnover” (único ciclo de polimerización), utilizando un exceso de enzima (300 nM) frente a sustrato (la concentración de 31/21-mer fue de 100 nM) y midiendo la cantidad de producto formado a distintas concentraciones de 3TCTP (**Figura 31C**). Estas condiciones fueron seleccionadas para la eliminar la influencia de la tasa de recambio de la enzima ( $k_{\text{off}}$ ) ya que ésta interfiere en la medida de constantes cinéticas a bajas tasas de incorporación.





**Figura 31. Parámetros cinéticos para la incorporación de dCTP y 3TCTP en el estado pre-estacionario obtenidos con la RT WT (NL4-3) y las RTs mutantes T69A y  $\Delta$ 69.** (A) Secuencia del complejo molde-iniciador 31C/21P con el que se llevaron a cabo las cinéticas de incorporación. A una mezcla preincubada de la RT (50 nM) y 31T/21P marcado con  $^{32}$ P en el extremo 5' (100 nM) se le añadió concentraciones crecientes de dCTP (B) y 3TCTP (C) en un tampón que contenía  $Mg^{2+}$  a 12,5 mM (concentración final). Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados y los productos se analizaron mediante geles de poliacrilamida y urea. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos a la ecuación  $[P] = A \times (1 - e^{-k_{obs} \times t}) + k_{ss} \times t$ , para dCTP y  $[P] = A \times (1 - e^{-k_{obs} \times t})$  para 3TCTP. Las tasas de incorporación de la RT WT (NL4-3) y de las RTs mutantes T69A y  $\Delta$ 69 en presencia de concentraciones crecientes de dCTP y 3TCTP se muestran en los paneles (D) y (E), respectivamente. Las cinéticas de incorporación ( $k_{obs}$ ) se representaron frente a las concentraciones de nucleótido y los datos se ajustaron a la ecuación hiperbólica:  $k_{obs} = k_{pol} \times [dNTP] / (K_d + [dNTP])$  para obtener los valores de las constantes de afinidad aparente ( $K_d$ ) y catalítica ( $k_{pol}$ ).

Después de ajustar los datos de incorporación de dCTP y 3TCTP a la ecuación de Michaelis-Menten, se obtuvieron las constantes catalíticas de incorporación de nucleótido ( $k_{pol}$ ) y de afinidad aparente ( $K_d$ ) para las cuatro enzimas estudiadas. Para el dCTP, se obtuvieron curvas hiperbólicas similares con todas las RTs, mientras que para el 3TCTP, el mutante  $\Delta 69$  resultó ser más resistente al 3TCTP, al necesitar más inhibidor para llegar a la velocidad máxima de incorporación (**Figura 31D,E**). Los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la **Tabla 8**. La eficacia catalítica ( $k_{pol}/K_d$ ) para la incorporación de 3TCTP fue 1400 veces inferior a la observada para dCTP en reacciones catalizadas por la RT WT (NL4-3) y por el mutante T69A. Sin embargo, el mutante  $\Delta 69$  mostró una eficacia catalítica 9000 veces menor para la incorporación de 3TCTP que para la incorporación de dCTP. Esta baja eficacia catalítica para la incorporación de 3TCTP es consecuencia de un incremento en la  $K_d$  de 8, 6 y 23 veces y un descenso de 175, 235 y 386 veces de la  $k_{pol}$  para las RTs WT (NL4-3), T69A y  $\Delta 69$ , respectivamente.

**Tabla 8. Parámetros cinéticos en el estado pre-estacionario para la incorporación de nucleótidos por parte de la RT WT (NL4-3) y los mutantes T69A y  $\Delta 69$ .**

| Enzima                        | dNTP  | $k_{pol}$ ( $s^{-1}$ )         | $K_d$ ( $\mu M$ ) | $k_{pol}/K_d$ ( $\mu M^{-1} s^{-1}$ ) | Selectividad <sup>a</sup>      |
|-------------------------------|-------|--------------------------------|-------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| <b>WT (NL4-3)</b>             | dCTP  | $9,8 \pm 0,4$                  | $3,7 \pm 0,7$     | $2,7 \pm 0,5$                         |                                |
|                               | 3TCTP | $(5,6 \pm 0,5) \times 10^{-2}$ | $29,2 \pm 5,7$    | $(1,92 \pm 0,41) \times 10^{-3}$      | $(7,2 \pm 2,1) \times 10^{-4}$ |
| <b><math>\Delta 69</math></b> | dCTP  | $8,5 \pm 0,5$                  | $1,6 \pm 0,5$     | $5,4 \pm 1,8$                         |                                |
|                               | 3TCTP | $(2,2 \pm 0,1) \times 10^{-2}$ | $37,4 \pm 5,8$    | $(5,9 \pm 1,0) \times 10^{-4}$        | $(1,1 \pm 0,4) \times 10^{-4}$ |
| <b>T69A</b>                   | dCTP  | $10,6 \pm 0,8$                 | $4,3 \pm 1,6$     | $2,5 \pm 0,9$                         |                                |
|                               | 3TCTP | $(4,5 \pm 0,6) \times 10^{-2}$ | $25,4 \pm 7,4$    | $(1,8 \pm 0,6) \times 10^{-3}$        | $(7,1 \pm 3,6) \times 10^{-4}$ |

Se utilizó el complejo molde-iniciador 31C/21P como sustrato (**Figura 31A**). Los datos se muestran como el valor medio  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo. Cada uno de los ensayos fue realizado al menos 2 veces independientemente. La variabilidad entre los distintos ensayos fue inferior al 20%.

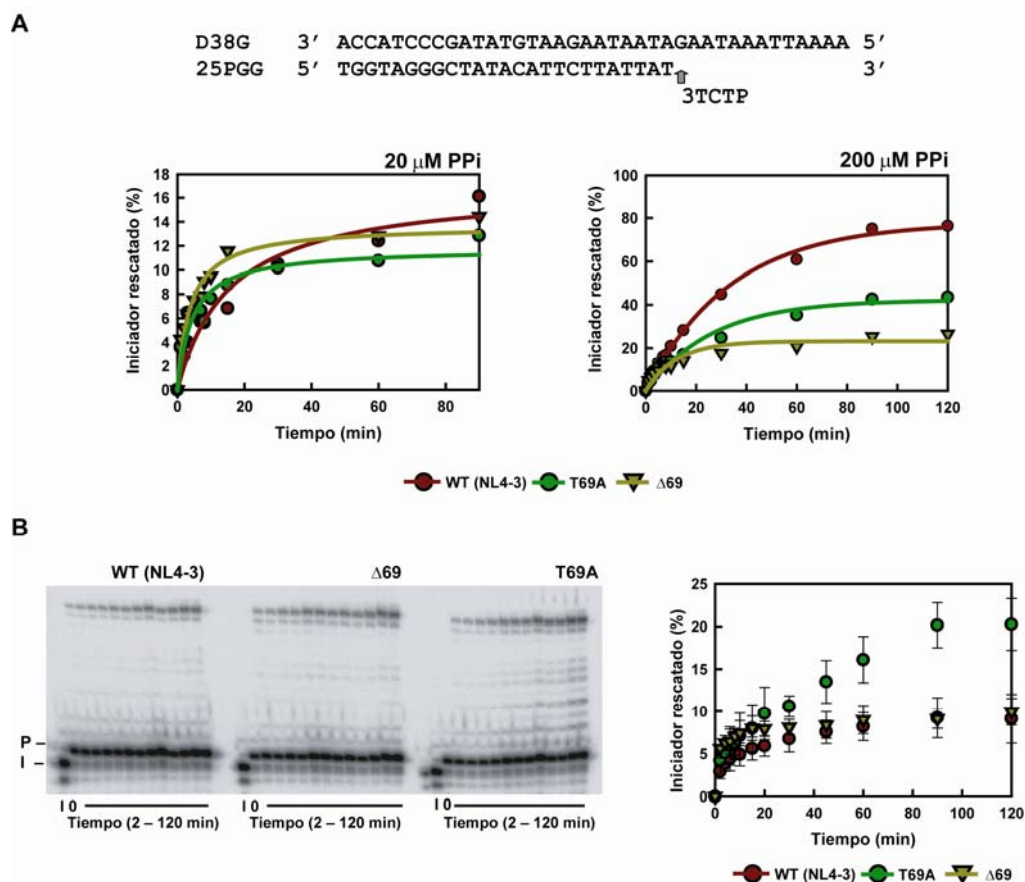
<sup>a</sup> Selectividad =  $[k_{pol}/K_d (3TCTP)]/[k_{pol}/K_d (dCTP)]$ .

Los parámetros cinéticos para la incorporación de dCTP fueron similares para las tres enzimas utilizadas, aunque la RT mutante  $\Delta 69$  mostró una eficacia catalítica 2 veces mayor aproximadamente, debido a que presentó una  $K_d$  inferior para dCTP, con respecto a las otras dos enzimas. Por otro lado, la RT mutante  $\Delta 69$  presenta una eficacia catalítica para la incorporación de 3TCTP tres veces inferior a la de las RTs WT (NL4-3) y T69A. Así, el efecto combinado de una mejor incorporación de dCTP y una peor incorporación de 3TCTP por parte de la RT  $\Delta 69$ , reduce 7 veces aproximadamente la capacidad de la enzima para discriminar entre dCTP y 3TCTP.

Estos resultados nos sugieren que la baja resistencia fenotípica al 3TCTP observada en virus que contienen la delección  $\Delta 69$  en un contexto de secuencia WT (NL4-3) de la RT del VIH-1, se puede atribuir a la disminución de la capacidad de la enzima para discriminar entre dCTP y 3TCTP.

#### **4.2.1.2 Escisión de 3TC-monofosfato (3TCMP) de iniciadores de DNA bloqueados**

Se ha observado que la actividad fosforolítica dependiente de ATP o PPi sobre iniciadores terminados con 3TCMP es muy baja para las RTs con elevada actividad fosforolítica dependiente de ATP, tal como se ha observado con la RT WT (BH10) (Mas *et al.*, 2002). Al aumentar la concentración de RT relativa a la concentración de molde-iniciador (condiciones de estado pre-estacionario), fuimos capaces de detectar escisión de 3TCMP en presencia de PPi 200  $\mu$ M, mientras que a concentraciones menores (por ejemplo, PPi 20  $\mu$ M), la eficiencia de la reacción de escisión fue muy baja (**Figura 32A**). La RT  $\Delta 69$  mostró menor actividad de escisión que las RTs T69A y WT (NL4-3) en presencia de PPi 200  $\mu$ M. En presencia de ATP 3,2 mM, tanto la RT WT (NL4-3) como el mutante  $\Delta 69$  mostraron una actividad de escisión muy baja (inferior al 10% de inhibidor rescatado) (**Figura 32B**).



**Figura 32. Efecto la delección ( $\Delta 69$ ) y la mutación T69A sobre la eficiencia de las reacciones de escisión de iniciadores bloqueados con 3TCTP en presencia de PPI y ATP.** (A) Las cinéticas de rescate de 3TCTP en presencia de PPI se llevaron a cabo con el molde-iniciador D38/25PGG (30 nM), cuya secuencia se muestra en la parte superior. Las cinéticas de rescate se llevaron a cabo en presencia de 20  $\mu$ M PPI (izquierda) y 200  $\mu$ M PPI (derecha) por la RT WT (NL4-3) y las RTs mutantes  $\Delta 69$  y T69A. (B) Los gels muestran las reacciones de rescate en presencia de ATP 3.2 mM, llevadas a cabo por la RT WT (NL4-3) y las mutantes  $\Delta 69$  y T69A. Las muestras analizadas en el gel corresponden al iniciador desbloqueado (pocillo I), al iniciador bloqueado (pocillo 0) y a las alícuotas retiradas 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 min después de añadir el ATP y una mezcla de dNTPs a una concentración final de 100  $\mu$ M (a excepción del dATP que se usó a 1  $\mu$ M). Las cinéticas de rescate catalizadas por la RT WT (NL4-3) y las RTs mutantes  $\Delta 69$  y T69A están representadas a la derecha. La concentración de enzima activa fue de 24 nM y de 72 nM en presencia de PPI y ATP, respectivamente. La concentración de 3TCTP en la reacción de bloqueo fue de 200  $\mu$ M. Los valores representados se obtuvieron de 2 a 3 experimentos independientes. Las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%.

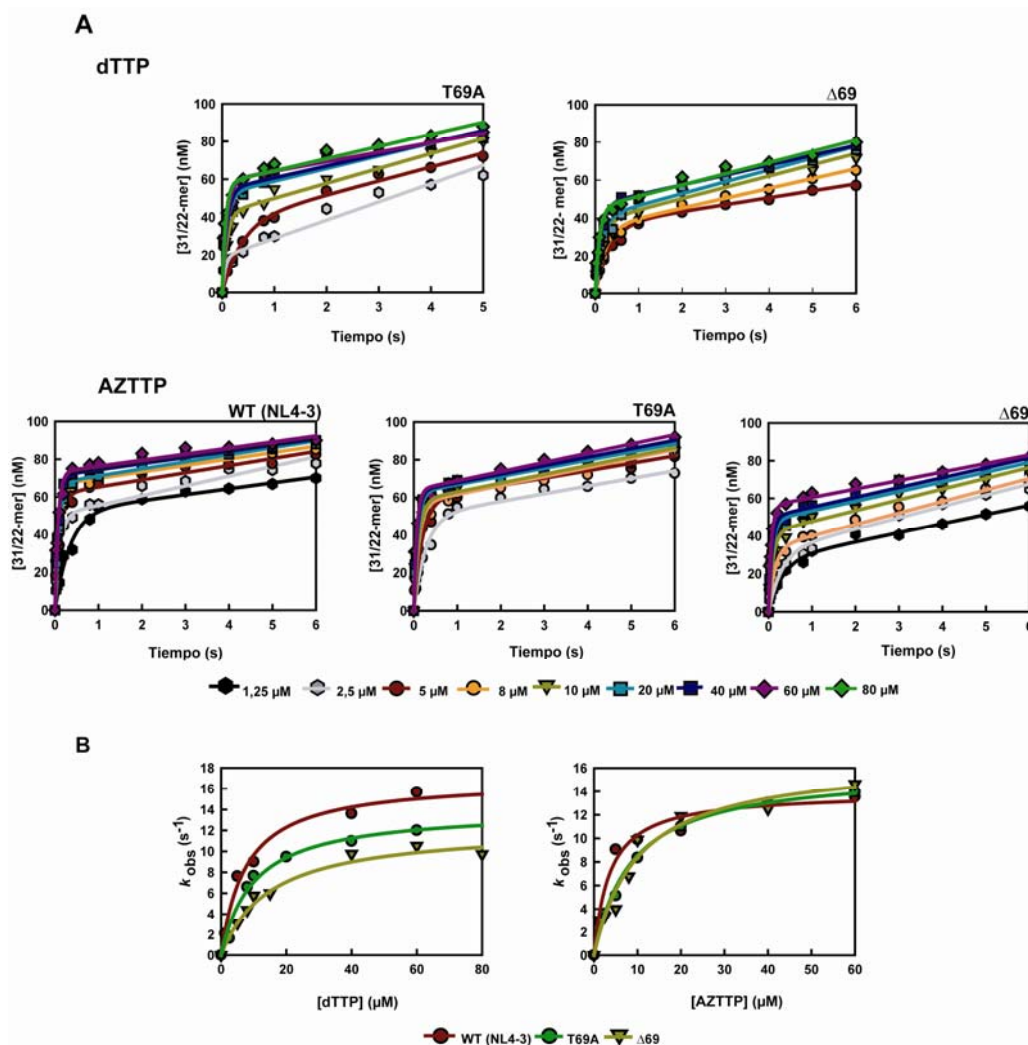
## 4.2.2 Efecto de la delección $\Delta 69$ sobre la hipersensibilidad al AZT

### 4.2.2.1 Discriminación entre dTTP y AZTTP analizada mediante ensayos cinéticos de incorporación de nucleótido en el estado pre-estacionario

Se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos en el estado pre-estacionario con la RT WT (NL4-3) y los mutantes T69A y  $\Delta 69$  para la incorporación de dTTP y AZTTP. En estos ensayos se utilizó el complejo molde-iniciador 31T/21P. Los parámetros cinéticos para la incorporación de dTTP catalizada por la RT WT (NL4-3) se recogen en el apartado 4.1.1 (Tabla 5) y las cinéticas de incorporación de dTTP se muestran en la Figura 22. Para todos los demás casos, las cinéticas de incorporación del

nucleótido correcto (dTTP) y el análogo a nucleótido (AZTTP) sobre el complejo 31T/21P se muestran en la **Figura 33**.

La constante catalítica de incorporación del nucleótido ( $k_{\text{obs}}$ ) se determinó a distintas concentraciones de dNTP. A partir de los valores de  $k_{\text{obs}}$  obtenidos se obtuvo la constante catalítica para la incorporación de dNTP ( $k_{\text{pol}}$ ) y la constante aparente de afinidad por el dNTP ( $K_d$ ) (**Figura 33B**). Los parámetros cinéticos obtenidos en el estado pre-estacionario se muestran en la **Tabla 9**.



**Figura 33. Parámetros cinéticos para la incorporación de dTTP y AZTTP en el estado pre-estacionario.** (A) Cinéticas de incorporación de dTTP y AZTTP sobre un complejo molde-iniciador 31T/21P en el estado pre-estacionario. A una mezcla preincubada de la RT (50 nM) y 31T/21P marcado con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5' (100 nM) se le añadieron concentraciones crecientes de dTTP y AZTTP en un tampón que contenía  $\text{Mg}^{2+}$  a 12,5 mM. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos a la ecuación  $[P] = A \times (1 - e^{-k_{\text{obs}} \times t}) + k_{\text{ss}} \times t$ . (B) Dependencia de la constante catalítica con la concentración de dTTP (izquierda) y AZTTP (derecha). Las constantes de velocidad ( $k_{\text{obs}}$ ) obtenidas de los ajustes del panel (A) se representaron frente a la concentración de dTTP. Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten. De esta forma, se obtuvieron los parámetros cinéticos  $k_{\text{pol}}$  y  $K_d$ . La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a la ecuación hiperbólica.

Los análisis cinéticos en el estado pre-estacionario revelaron que la RT WT (NL4-3) tiene una mayor eficacia catalítica ( $k_{pol}/K_d$ ) para la incorporación de dTTP, que las RTs mutantes  $\Delta 69$  y T69A (**Tabla 9**). Estas diferencias se deben a que la enzima tiene una mayor tasa de polimerización ( $k_{pol}$ ) y una menor afinidad por el nucleótido entrante ( $K_d$ ) (**Figura 33B**). La elevada eficacia catalítica de la enzima WT (NL4-3) también se observó en las reacciones de incorporación de AZTTP, debido a la elevada afinidad de la enzima por la forma trifosforilada del inhibidor. Por otro lado, las tres enzimas presentaban capacidades de discriminación entre AZTTP y dTTP parecidas, encontrándose todas en el rango de 1,31 a 2,13 (**Tabla 9**), indicando que ni T69A ni la delección  $\Delta 69$  afectan a la selectividad de nucleótido de una manera relevante.

**Tabla 9. Parámetros cinéticos en el estado pre-estacionario para la incorporación de dTTP y AZTTP por la RT WT (NL4-3) y los mutantes  $\Delta 69$  y T69A.**

| Enzima                        | Nucleótido | $k_{pol}$ (s <sup>-1</sup> ) | $K_d$ (μM) | $k_{pol}/K_d$ (μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | Selectividad <sup>a</sup> |
|-------------------------------|------------|------------------------------|------------|---|---------------------------|
| <b>WT (NL4-3)</b>             | dTTP       | 17,4 ± 2,0                   | 7,1 ± 2,5  | 2,47 ± 0,93                                       | 2,13 ± 1,02               |
|                               | AZTTP      | 13,4 ± 0,9                   | 2,5 ± 0,7  | 5,26 ± 1,57                                       |                           |
| <b><math>\Delta 69</math></b> | dTTP       | 12,3 ± 1,0                   | 14,8 ± 3,0 | 0,83 ± 0,18                                       | 2,02 ± 0,61               |
|                               | AZTTP      | 16,7 ± 1,1                   | 9,9 ± 2,0  | 1,68 ± 0,35                                       |                           |
| <b>T69A</b>                   | dTTP       | 14,2 ± 1,8                   | 10,1 ± 4,1 | 1,41 ± 0,60                                       | 1,31 ± 0,58               |
|                               | AZTTP      | 15,8 ± 0,6                   | 8,5 ± 1,1  | 1,85 ± 0,24                                       |                           |

Se utilizó el molde-iniciador 31T/21P como sustrato. Los datos se muestran como el valor medio ± desviación estándar de un experimento representativo. Cada uno de los ensayos fue realizado al menos dos veces de forma independiente. La variabilidad entre los ensayos fue inferior al 20%.

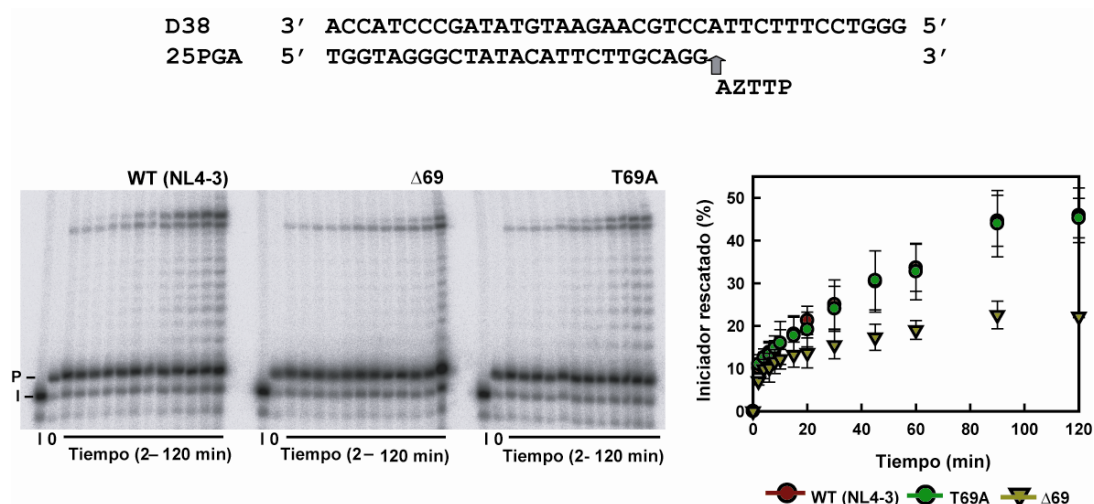
<sup>a</sup> Selectividad =  $[k_{pol}/K_d \text{ (AZTTP)}]/[k_{pol}/K_d \text{ (dTTP)}]$

#### 4.2.2.2 Escisión de AZTMP de iniciadores de DNA bloqueados

Dado que no se observaron diferencias significativas entre las mutantes y la RT WT (NL4-3) en su capacidad para discriminar entre dTTP y AZTTP, se llevaron a cabo ensayos de escisión con la RT WT (NL4-3) y las RTs mutantes T69A y  $\Delta 69$  para determinar si la hipersensibilidad al AZTTP observada en ensayos fenotípicos por el mutante  $\Delta 69$  estaba relacionada con esta vía de resistencia. La habilidad de las RTs para escindir iniciadores bloqueados con AZTMP se estudió utilizando el complejo molde-iniciador D38/25PGA (**Figura 34**).



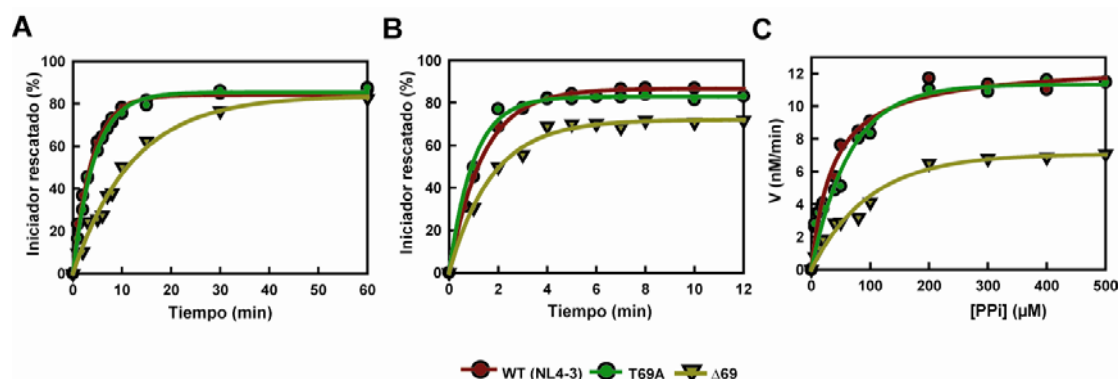
En presencia de ATP, todas las enzimas mostraron una baja actividad fosforolítica sobre iniciadores bloqueados con AZT (Figura 34). Sin embargo, la escisión dependiente de ATP mostrada por la enzima mutante  $\Delta 69$  fue alrededor de dos veces inferior a la presentada tanto por la RT WT (NL4-3) como por el mutante T69A, que mostraron niveles similares de escisión (Figura 34).



**Figura 34. Efecto de la delección ( $\Delta 69$ ) y la mutación T69A sobre la eficiencia de las reacciones de escisión de iniciadores bloqueados con AZTTP en presencia de ATP.** En la parte superior se muestra la secuencia del complejo molde-iniciador heteropolimérico D38/25PGA utilizado en las reacciones de rescate. En primer lugar, el AZTTP se incorporó en el iniciador (I) (pocillo I) en la posición +1, para generar un producto (P) (pocillo 0) de 26 nucleótidos. La escisión del AZTTP y posterior extensión del iniciador se hizo en presencia de ATP (3,2 mM) y una mezcla de dNTPs (dCTP, dGTP y dTTP, a 100  $\mu$ M cada uno y dATP a 1  $\mu$ M). Se retiraron alícuotas al cabo de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 min, después de la adición de ATP. A la derecha se muestran las cinéticas de rescate catalizadas por la RT WT (NL4-3) y las mutantes  $\Delta 69$  y T69A. La concentración de enzima activa en estos ensayos fue de 30 nM y 72 nM en presencia de PPi y ATP, respectivamente. Los valores representados se obtuvieron de 3 experimentos independientes.

Los efectos de la delección también se observaron en la actividad fosforolítica de la RT en presencia de PPi (Figura 35). Tanto en presencia de PPi 20  $\mu$ M como en presencia de PPi 200  $\mu$ M, la RT portadora de la delección mostró una actividad fosforolítica reducida sobre iniciadores bloqueados con AZTTP (Figura 35A,B). Esta baja actividad se observó en un rango amplio de concentraciones de PPi (Figura 35C).

Los parámetros cinéticos de escisión de AZTTP en función de la concentración de PPi para las tres enzimas se muestran en la Tabla 10. La eficiencia de eliminación del AZTTP en presencia de PPi fue casi 5 veces inferior en reacciones catalizadas por el mutante portador de la delección  $\Delta 69$ , en comparación con la RT WT (NL4-3). El mutante T69A presentó una ligera disminución en su eficiencia de escisión con respecto a la RT WT (NL4-3) debido a un ligero aumento en el valor de su  $K_m$  (Tabla 10).



**Figura 35.** Efecto de la delección ( $\Delta 69$ ) y la mutación T69A sobre las cinéticas de las reacciones de escisión de iniciadores bloqueados con AZTMP en presencia de PPI. Las cinéticas de rescate se llevaron a cabo en presencia de PPI 20  $\mu\text{M}$  (A) y PPI 200  $\mu\text{M}$  (B). Se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA a 30 nM. La concentración de todos los dNTPs en el ensayo fue de 100  $\mu\text{M}$ , excepto el dATP que se usó a 1  $\mu\text{M}$ . La concentración de enzima activa fue de 24 nM. Los valores representados se obtuvieron a partir de 2 a 3 experimentos independientes. Las desviaciones estándar fueron inferiores al 20% en todos los experimentos. (C) Dependencia de la velocidad de escisión de AZTMP en función de la concentración de PPI para la RT WT (NL4-3) y las RTs mutantes  $\Delta 69$  y T69A.

**Tabla 10.** Parámetros cinéticos de escisión de AZTMP en función de la concentración de PPI para la RT WT (NL4-3) y las RTs mutantes  $\Delta 69$  y T69A.

| Enzima      | $k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | $K_m$ ( $\mu\text{M}$ ) | $k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ ) |
|-------------|--|-------------------------|--|
| WT (NL4-3)  | $0,52 \pm 0,02$                        | $36,9 \pm 4,8$          | $(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-2}$                             |
| $\Delta 69$ | $0,29 \pm 0,02$                        | $93,5 \pm 14,9$         | $(3,0 \pm 0,5) \times 10^{-3}$                             |
| T69A        | $0,45 \pm 0,02$                        | $53,0 \pm 9,5$          | $(8,0 \pm 1,6) \times 10^{-3}$                             |

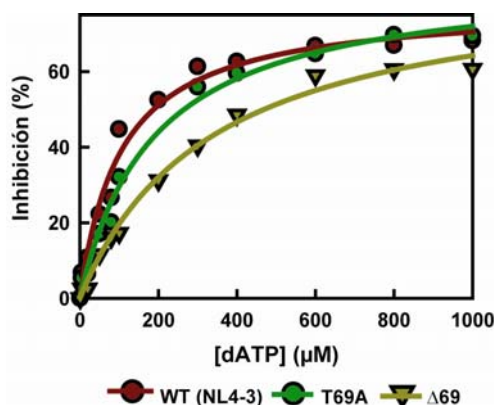
El rango de concentración de PPI en los ensayos fue de 20 a 500  $\mu\text{M}$ . El porcentaje de inhibidor rescatado fue representado frente a la concentración de PPI y los datos se ajustaron a una ecuación hiperbólica para determinar las constantes cinéticas  $k_{\text{cat}}$  y  $K_m$ . Se realizaron de 2 a 3 experimentos independientes con cada RT. La variabilidad entre distintos ensayos fue inferior al 20%.

#### 4.2.2.3 Inhibición de la reacción de escisión por el siguiente nucleótido complementario

Estudios llevados a cabo en varios laboratorios demostraron que la reacción de escisión de análogos de timidina puede ser inhibida por el dNTP complementario a la posición +1 del molde, debido a la formación de un complejo estable (“dead-end complex”) que bloquea la reacción (Tong *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2000; Mas *et al.*, 2000, 2002). Analizamos la capacidad del dATP para inhibir la reacción de rescate dependiente de PPI con la enzima WT (NL4-3) y los mutantes T69A y  $\Delta 69$  utilizando el complejo molde-iniciador D38/25PGA bloqueado con AZTMP.



Las diferencias entre las tres enzimas utilizadas fueron relativamente pequeñas, aunque  $\Delta 69$  es algo más resistente a la inhibición por dATP (**Figura 36**). Los valores de  $CI_{50}$  obtenidos fueron:  $112,2 \pm 26,2 \mu M$  para la RT WT (NL4-3),  $170,9 \pm 19,4 \mu M$  para T69A y  $408,1 \pm 90,9 \mu M$  para  $\Delta 69$ .



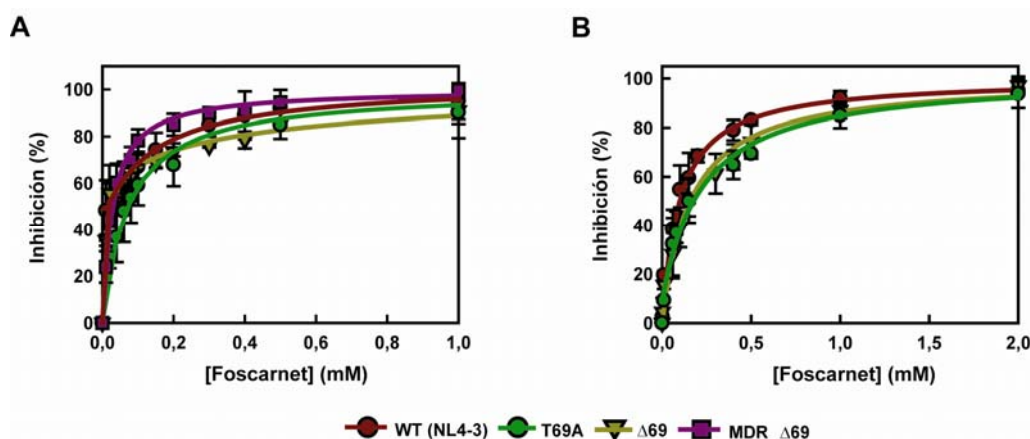
**Figura 36. Inhibición de la reacción de escisión por el siguiente nucleótido complementario en presencia de PPi, y utilizando iniciadores bloqueados con AZTMP.** La concentración de PPi en los ensayos fue de  $200 \mu M$ . Todos los dNTPs se administraron a  $100 \mu M$ , a excepción de dATP cuyas concentraciones variaron entre  $1 \mu M$  y  $1 mM$ , dependiendo del ensayo. La concentración de enzima activa fue de  $24 nM$ , y la concentración de molde-iniciador (D38/25PGA) fue de  $30 nM$ . Las muestras se incubaron durante 0-5 min, dependiendo del ensayo. En todos los casos, los tiempos de incubación estuvieron dentro del rango lineal de la cinética correspondiente. El porcentaje de inhibición se representó frente a la concentración de dATP, y los datos se ajustaron a una hipérbola para obtener la  $CI_{50}$  de cada enzima. Se realizaron de 3 a 5 experimentos independientes y se obtuvieron los valores de  $CI_{50}$  siguientes:  $112,2 \pm 26,2 \mu M$  para la RT WT (NL4-3),  $170,9 \pm 19,4 \mu M$  para el mutante T69A y  $408,1 \pm 90,9 \mu M$  para la RT  $\Delta 69$ .

#### 4.2.3 Efecto de la delección $\Delta 69$ sobre la sensibilidad a foscarnet

Estudios previos han demostrado que varias mutaciones que confieren resistencia a foscarnet aumentan la susceptibilidad viral al AZT (Meyer *et al.*, 2003b). Por otro lado, el foscarnet puede actuar como un sustrato alternativo de la reacción de escisión de iniciadores bloqueados con AZTMP catalizada por la RT (Cruchaga *et al.*, 2006). La hipersensibilidad al AZT causada por la delección  $\Delta 69$  se debe a una disminución de la actividad fosforolítica de la RT, sobre iniciadores bloqueados con AZT. Por ello, estudiamos los efectos de foscarnet sobre las reacciones de incorporación y escisión de nucleótido.

##### 4.2.3.1 Determinación de los valores de $CI_{50}$ para foscarnet en ensayos de incorporación de dTTP y AZTTP

Se determinó la concentración inhibitoria al 50% de foscarnet con las enzimas WT (NL4-3), T69A,  $\Delta 69$  y MDR\_ $\Delta 69$  en reacciones de incorporación de dTTP y con las enzimas WT (NL4-3), T69A y  $\Delta 69$  en reacciones de incorporación de AZTTP. Las cinéticas de inhibición se muestran en la **Figura 37** y las  $CI_{50}$ s obtenidas se muestran en la **Tabla 11**.



**Figura 37. Inhibición por foscarnet de la incorporación de (A) dTTP y (B) AZTTP.** Las reacciones se llevaron a cabo mediante la adición de dTTP al complejo molde-iniciador 31T/21P y RT en presencia de diferentes concentraciones de foscarnet. Se representó el porcentaje de inhibición de la reacción de elongación frente a la concentración de foscarnet y los datos se ajustaron a una hipérbola para obtener la concentración inhibitoria al 50% ( $CI_{50}$ ) correspondiente. Las concentraciones de RT, 31T/21P y dTTP en el ensayo fueron de 12-40 nM, 100 nM y 5  $\mu$ M, respectivamente. Los valores representados se obtuvieron de 3 a 5 experimentos independientes.

**Tabla 11. Inhibición por foscarnet de la reacción de incorporación de dTTP y AZTTP en un complejo molde-iniciador DNA/DNA en distintas RTs.**

| Enzimas          | $CI_{50}$ foscarnet ( $\mu$ M) |                  |
|------------------|--------------------------------|------------------|
|                  | dTTP                           | AZTTP            |
| WT (NL4-3)       | 110,0 $\pm$ 32,5               | 98,8 $\pm$ 6,8   |
| $\Delta$ 69      | 93,7 $\pm$ 20,6                | 157,7 $\pm$ 11,4 |
| T69A             | 307,5 $\pm$ 119,5              | 164,6 $\pm$ 16,5 |
| MDR_ $\Delta$ 69 | 48,3 $\pm$ 12,6                | ND               |

La concentración de molde-iniciador 31T/21P fue de 200 nM y la concentración de enzima utilizada fue de 24-80 nM. La concentración de dTTP y AZTTP utilizada en el ensayo fue de 5  $\mu$ M. Las muestras se incubaron durante 30 s. En todos los casos los tiempos de incubación estuvieron dentro del rango lineal de las cinéticas correspondientes. El porcentaje de inhibición fue representado frente a la concentración de foscarnet y los datos se ajustaron a una hipérbola para obtener la  $CI_{50}$  para cada enzima. Los datos mostrados fueron obtenidos a partir de 3 a 5 experimentos independientes y se expresan como media  $\pm$  desviación estándar.

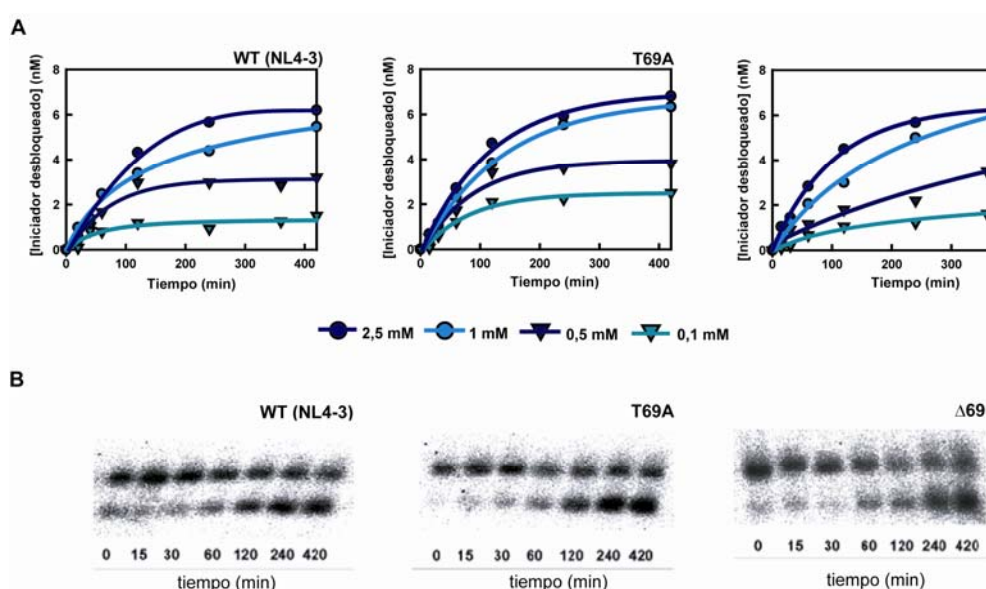
ND, no determinado, debido a que la RT presentaba una baja eficiencia de incorporación de AZTTP.

No se observaron diferencias importantes en la sensibilidad a foscarnet entre las distintas enzimas, tanto en reacciones de incorporación de AZTTP como en reacciones de incorporación de dTTP. Sin embargo, con la RT T69A se observó un aumento de la  $CI_{50}$  para foscarnet de aproximadamente 3 veces con respecto a la RT WT (NL4-3), en ensayos de incorporación de dTTP. La delección  $\Delta$ 69 no afecta de forma significativa a la resistencia a foscarnet, en reacciones de incorporación de dTTP, aunque se observa un ligero aumento de la  $CI_{50}$  en reacciones de incorporación de AZTTP. Además, se llevaron a cabo ensayos de inhibición con fosfonoacetato, que es otro análogo a PPI. Sin

embargo, ninguna de las RTs estudiadas se mostró susceptible al inhibidor, a concentraciones superiores a 10 mM (datos no mostrados).

#### 4.2.3.2 Escisión de AZTMP en presencia de foscarnet en condiciones de estado pre-estacionario

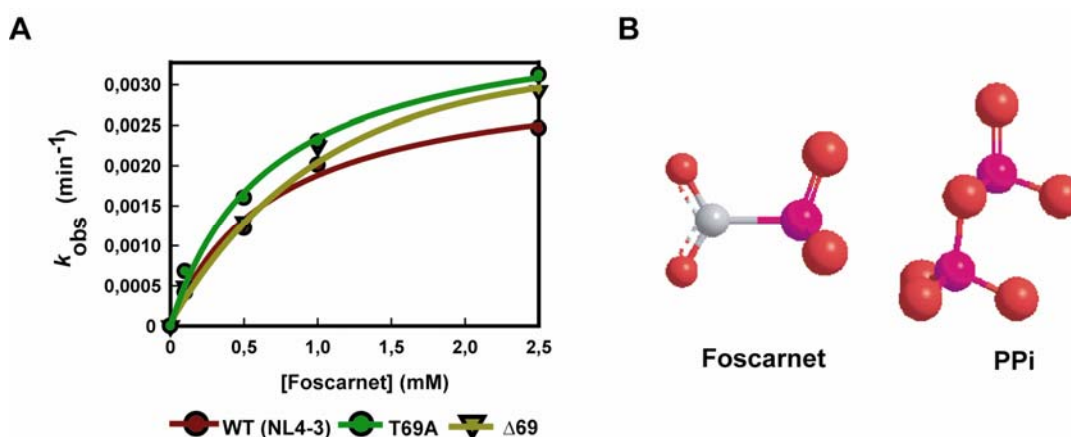
Se llevaron a cabo ensayos de escisión dependiente de foscarnet con la RT WT (NL4-3) y las RTs mutantes T69A y  $\Delta 69$ . Para estos ensayos se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA que contenía un iniciador bloqueado con AZTMP (D38/25PGA<sup>AZT</sup>). Las cinéticas de escisión del AZTMP sobre el complejo D38/25PGA<sup>AZT</sup> se muestran en la **Figura 38**. La velocidad de escisión del AZT ( $k_{obs}$ ) se determinó usando distintas concentraciones de foscarnet.



**Figura 38.** Escisión del AZTMP sobre un complejo molde-iniciador D38/25PGA<sup>AZT</sup> en condiciones de estado pre-estacionario. (A) A una muestra preincubada de la RT (30 nM) y D38/25PGA<sup>AZT</sup> (12,5 nM) marcado con <sup>32</sup>P en el extremo 5' del iniciador se le añadieron diferentes concentraciones de foscarnet (2,5 mM, 1 mM, 0,5 mM y 0,1 mM) en un tampón HEPES 50 mM (pH 7,0). Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados y los productos se analizaron mediante geles de poliacrilamida y urea. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos a la ecuación  $[P] = A \times (1 - e^{-k_{obs} \times t})$ . Los valores representados se obtuvieron de 2 a 3 experimentos independientes. Las desviaciones estándar fueron inferiores al 20%. (B) Geles mostrando las reacciones de escisión de AZTMP llevadas en presencia de foscarnet 2,5 mM para las enzimas WT (NL4-3),  $\Delta 69$  y T69A. Se retiraron alícuotas al cabo de 0, 15, 30, 60, 120, 240 y 420 min, después de la adición de foscarnet.

La dependencia de la constante de velocidad de la reacción de fosforólisis ( $k_{obs}$ ) con la concentración de foscarnet, se analizó ajustando los datos a una ecuación hiperbólica (**Figura 39**). Así, se obtuvieron los valores de  $K_d$  y  $k_{es}$ , correspondientes a la constante aparente de afinidad por foscarnet y a la constante de velocidad de la reacción de escisión, respectivamente. Los parámetros cinéticos obtenidos en el estado pre-estacionario se muestran en la **Tabla 12**. Las tres enzimas fueron capaces de escindir al

AZTMP en presencia de foscarnet, con cinéticas de escisión similares y eficiencias de escisión parecidas. Sin embargo, las constantes de escisión ( $k_{es}$ ) fueron sensiblemente inferiores a las obtenidas con PPI, lo que nos indica que el foscarnet no es un análogo a pirofosfato eficiente en reacciones de escisión.



**Figura 39. Efecto de las mutaciones en las reacciones de escisión de iniciadores bloqueados con AZTMP en presencia de foscarnet.** (A) Dependencia de la tasa de escisión con la concentración de foscarnet sobre un complejo molde-iniciador D38/25PGA<sup>AZT</sup> con la RT WT (NL4-3) y las RTs mutantes  $\Delta 69$  y T69A. Las velocidades de primer orden ( $k_{obs}$ ) obtenidas se representaron frente a la concentración de foscarnet. Los datos se ajustaron a la ecuación hiperbólica  $k_{obs} = k_{es} \times [PFA]/(K_d + [PFA])$ . Así se obtuvieron los parámetros cinéticos  $K_d$  y  $k_{es}$ . La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a la ecuación hiperbólica. (B) Estructuras de foscarnet y PPI. Los átomos de oxígeno, fosfato y carbono se representan en rojo, rosado y gris respectivamente.

**Tabla 12. Parámetros cinéticos de escisión de AZTMP en función de la concentración de foscarnet para la RT WT (NL4-3) y los mutantes  $\Delta 69$  y T69A.**

| Enzima      | $k_{es}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | $K_d$ ( $\mu\text{M}$ ) | $k_{es}/K_d$ ( $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ) |
|-------------|--------------------------------|-------------------------|---|
| WT (NL4-3)  | $(3,2 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ | $710 \pm 140$           | $(4,5 \pm 1,0) \times 10^{-6}$                      |
| $\Delta 69$ | $(4,4 \pm 0,8) \times 10^{-3}$ | $1190 \pm 480$          | $(3,7 \pm 2,0) \times 10^{-6}$                      |
| T69A        | $(4,2 \pm 0,9) \times 10^{-3}$ | $810 \pm 450$           | $(5,2 \pm 3,0) \times 10^{-6}$                      |

Se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA<sup>AZTTP</sup>. La concentración de enzima activa y complejo molde-iniciador en el ensayo fue de 30 nM y 12,5 nM, respectivamente. Los datos se muestran como el valor medio  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes.

### 4.3 Papel de las delecciones $\Delta 67$ y $\Delta 69$ en el mecanismo de escisión dependiente de ATP o PPI de RTs del VIH-1 portadoras de mutaciones de resistencia a análogos a timidina (TAMs)

La delección  $\Delta 69$  en la horquilla  $\beta 3\text{-}\beta 4$  de la RT aparece con frecuencia en aislados virales con RTs que contienen una o más mutaciones del complejo de la Q151M (A62V, V75I, F77L, F116Y y Q151M), y a veces M184V (Winters *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Winters y Merigan., 2001; Baxter *et al.*, 2006; Villena *et al.*, 2007). Sin embargo, otra delección observada frecuentemente en aislados virales de pacientes tratados, implica la pérdida del codón 67 ( $\Delta 67$ ) en la región codificante de la RT y suele aparecer acompañada por las sustituciones de aminoácidos T69G y K70R, además de una a tres TAMs (Imamichi *et al.*, 2000a,b; Ross *et al.*, 2000; Tamalet *et al.*, 2000; Masquelier *et al.*, 2001).

Con el objeto de ver si estas observaciones estaban fundamentadas en la información disponible actualmente, llevamos a cabo una búsqueda de secuencias de RTs con delecciones entre las posiciones 67 a 70 de la RT del VIH-1 en la base de datos de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>). Analizamos las mutaciones que acompañan a las delecciones ubicadas en el subdominio “fingers” de la RT del VIH-1. Se encontraron 62 secuencias, que se clasificaron en 3 grupos distintos que denominamos: (a) **Grupo 1**, constituido por 32 secuencias que se caracterizan por llevar delecciones en la posición 69 y Asp en la posición 67; (b) **Grupo 2**, constituido por 25 secuencias cuya principal característica es que llevan delecciones en la posición 67; y (c) **Grupo 3**, constituido por 5 secuencias caracterizadas por llevar Asn en la posición 67 y delecciones en la posición 69 (Tabla 13, Figura 40).

**Tabla 13. Análisis de mutaciones de resistencia asociadas a delecciones encontradas entre los codones 67-70 de la RT del HIV-1.**

| Grupo | Número de Secuencias | Sustituciones de aminoácido |       |       |       |      |       |         |         |      |      |       |       |
|-------|----------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|------|-------|---------|---------|------|------|-------|-------|
|       |                      | TAMs1                       |       |       | TAMs2 |      |       |         | C Q151M |      |      |       |       |
|       |                      | M41L                        | L210W | T215Y | D67N  | K70R | T215F | K219Q/E | A62V    | V75I | F77L | F116Y | Q151M |
| 1     | 32                   | 1                           | 0     | 2     | 0     | 3    | 0     | 0       | 9       | 9    | 7    | 6     | 14    |
| 2     | 25                   | 17                          | 3     | 5     | 0     | 22   | 16    | 23      | 2       | 1    | 0    | 1     | 1     |
| 3     | 5                    | 4                           | 3     | 3     | 5     | 2    | 0     | 3       | 1       | 1    | 1    | 2     | 2     |

Se representa el número de secuencias en las que se encontró la mutación con respecto al número total de secuencias de cada grupo. Los datos encuadrados corresponden a las mutaciones más representativas de cada grupo. Las TAMs se clasifican en dos grupos de acuerdo a su asociación en muestras clínicas: TAMs1 (M41L, L210W y T215Y), y TAMs2 (D67N, K70R, T215F, y K219Q/E).



## Resultados

**A**

```

      40      *      60      *      80      *      100      *      120      *
WT (NL4-3) : ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDKTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
D69_02118: ...IEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDENFRKYTAF
D69_02123: ...LEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
1_D70_g02: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-SWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
1_D70_031: ...VKICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-TWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
D69_914-N: ...IEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTAXSVIKKNDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
1_D70_021: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
12_D69_87: ...---CEEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDESFRKYTAF
1_D69_Q51: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
4_D69_V62: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
D69_32094: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNSPIFAVKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
D69_32093: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNSPIFAVKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
1_D70_031: ...IEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-TWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
13_D69_93: ...---CEEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
D69_02120: ...IEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
D69_CA388: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
D69_02119: ...IEICTELEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
D69_02131: ...LEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
D69_BREPM: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
D69_7152w: ...LEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
2_D69_Q48: ...LEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
16_D69_85: ...---CEEMEKEGKISKIGPENPYNTPIFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
d69_06arc: ...TEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
D69_03113: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDESFRKYTAF
D69_03118: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
D69_03124: ...LEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
D69_03126: ...LEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDENFRKYTAF
25_67_ca3: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
15_D69_93: ...---CEEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
1_D70_BRE: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-SWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
d69_9438t: ...---CEDMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDENFRKYTAF
d69_ICH02: ...-----EMEKEGKISKIGPENPYNTPIFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDESFRKYTAF
D69_02133: ...MEKCTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
*****

```

**B**

```

      40      *      60      *      80      *      100      *      120      *
WT (NL4-3) : ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDKTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
1_67_v196: ...VEICNELEEEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
2_67_q712: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
3_67_CA26: ...VEICNELEEEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
6_67_BM-5: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
9_67_CA23: ...VEICNELEEEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
10_67_031: ...MEICAELEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
12_67_48-: ...VEICDELEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
14_67_48-: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
16_67_48-: ...MEICAELEEEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
19_67_031: ...VEICAELEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
20_67_031: ...VEICNELEEEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
23_67_ca2: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
24_67_ca3: ...VEICTELEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
13_67_48-: ...IEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
21_67_031: ...VEICTELEKEGKISKIGPENPYNTPIFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
18_67_031: ...VEICTELEEEGKISKIGPENPYNTPIFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
5_67_BM-5: ...IKICTELEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDENFRKYTAF
9_D69_488: ...VEICTELEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
22_67_031: ...IEICTELEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
7_67_BM-5: ...---TEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
17_67_031: ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPIFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
15_67_48-: ...VEICTELEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
8_67_6426: ...VEICTELEEEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
4_67_BM-4: ...VEICTELEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKK-SGWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
*****

```

**C**

```

      40      *      60      *      80      *      100      *      120      *
WT (NL4-3) : ...VEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDKTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
D69_02120: ...VEICTELEEDGKISKIGPENPYNTPIFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
D69_03121: ...IEICTELEEDGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAF
7_D69_483: ...VEICSELEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
8_D69_484: ...TEICAELEKEGKISKIGPENPYNTPIFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKEFRKYTAF
3_D69_Q75: ...LEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDG-KWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAF
*****

```

(continuación de Figura...)

```

140      *      160      *      180      *      200      *      220
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :WT (NL4-3)
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_02118
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_02123
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :1_D70_g02
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :1_D70_031
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_914-N
TIPSTNNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :1_D70_021
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :12_D69_87
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :1_D69_Q51
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :4_D69_V62
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_32094
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_32093
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :1_D70_031
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :13_D69_93
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_02120
TIPSTNNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_CA388
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_02119
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_02131
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_BREPM
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_7152w
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :2_D69_Q48
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :16_D69_85
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_06arc
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_03113
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_03118
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_03124
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_03126
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :25_67_ca3
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :15_D69_93
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :1_D70_BRE
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_9438t
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_ICH02
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_02133
*****

140      *      160      *      180      *      200      *      220
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :WT (NL4-3)
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :1_67_v196
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :2_67_q712
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :3_67_CA26
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :6_67_BM-5
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :9_67_CA23
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :10_67_031
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :12_67_48-
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :11_67_031
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :14_67_48-
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :16_67_48-
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :19_67_031
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :20_67_031
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :23_67_ca2
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :24_67_ca3
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :13_67_48-
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :21_67_031
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :18_67_031
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :5_67_BM-5
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :9_D69_488
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :22_67_031
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :7_67_BM-5
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :17_67_031
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :15_67_48-
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :8_67_6426
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :4_67_BM-4
*****

140      *      160      *      180      *      200      *      220
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :WT (NL4-3)
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_02120
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :D69_03121
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :7_D69_483
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :8_D69_484
TIPSINNETPGIRYQYNVLPQGKSGSPAIQCSMTKILEPFRKQNPDIIVIQYMDLLVYSGDLEIGQHRKIEELRQHLLRWGFTTPDKK... :3_D69_Q75
*****

```

**Figura 40. Alineamientos de secuencias portadoras de deleciones de un aminoácido en la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  de la RT del HIV-1.** Se identificaron 62 secuencias de RTs con una deleción entre las posiciones 67-70 de la RT del HIV-1 en la base de datos de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>) y se clasificaron. (A) Secuencias portadoras de una deleción que afecta a la posición 69 (32 secuencias). (B) Secuencias portadoras de una deleción que afecta a la posición 67 (25 secuencias). (C) Secuencias portadoras de deleciones que afectan a la posición 69 pero que además tienen el cambio D67N (5 secuencias). Las mutaciones pertenecientes al complejo de la Q151M (A62V, V75I, F77L, F116Y y Q151M) se encuentran sombreadas en rosado. Las posiciones asociadas a mutaciones del grupo de las TAMs1 (M41L, L210W y T215Y) se encuentran en amarillo y las asociadas a las TAMs2 (D67N, K70R, T215F y K219Q/E) en verde.

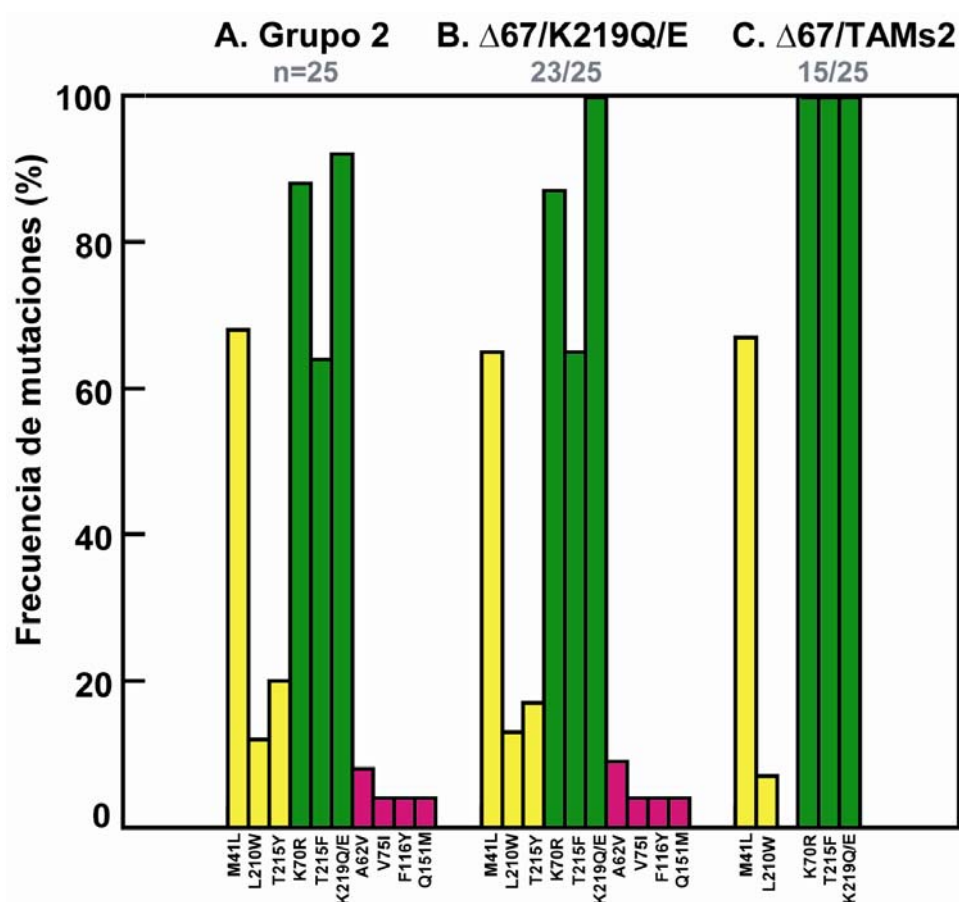
En la **Figura 40** se muestran las secuencias de estos tres grupos indicándose las mutaciones de resistencia del complejo de la Q151M (A62V, V75I, F77L, F116Y y Q151M), así como las mutaciones de resistencia a análogos a timidina (TAMs) (M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F y K219Q/E). La **Tabla 13** muestra la frecuencia con la que aparecen estas mutaciones de resistencia en los distintos grupos de secuencias.

Los resultados muestran que la mutación Q151M está comúnmente asociada a las secuencias portadoras de la delección  $\Delta 69$  pertenecientes al **Grupo 1** (**Tabla 13**). En la mayor parte de las ocasiones esta asociación viene acompañada de 2 o más mutaciones características del complejo de la Q151M como son A62V, V75I, F77L y F116Y. Sólo en 6 secuencias de las 32 del **Grupo 1** aparece alguna TAM (**Figura 40**, **Tabla 13**). Por otro lado, las mutaciones que encontramos asociadas al **Grupo 2**, portadoras de la delección  $\Delta 67$ , son otras. Así, las mutaciones del complejo de la Q151M aparecen en sólo 2 de las 25 secuencias analizadas, mientras que observamos TAMs en 23 de las 25 secuencias del **Grupo 2**. El cambio en la posición 219 (K219E o K219Q) es el que más predomina, seguido de la mutación K70R (**Figura 40**, **Tabla 13**). Por último, en el **Grupo 3**, correspondiente a secuencias portadoras de la delección  $\Delta 69$  y D67N, se observa una asociación tanto con TAMs1 como con TAMs2. Sólo en uno de los 5 casos analizados de este grupo se observan todas las mutaciones del complejo de la Q151M (**Figura 40**).

Estudiamos en detalle las mutaciones presentes en las secuencias del **Grupo 2** (portadoras de la delección  $\Delta 67$ ) (**Figura 41**). Observamos que en 23 de las 25 secuencias portadoras de  $\Delta 67$  y el cambio en la posición 219, el perfil de mutaciones se mantiene muy similar al del Grupo 2 (**Figura 41**, histograma B.  $\Delta 67$ /K219Q/E). Sin embargo, en 15 de las 25 secuencias que llevan la delección  $\Delta 67$  y las TAMs2 (K70R, T215F y K219Q o E), se elimina cualquier asociación de la delección  $\Delta 67$  con las mutaciones del complejo de la Q151M (**Figura 41**). Curiosamente, M41L aparece con frecuencia junto a la delección  $\Delta 67$ , aún cuando ésta aparece asociada principalmente con todas las TAMs2 (**Figura 41**).

Estos resultados son consistentes con la asociación de  $\Delta 69$  con mutaciones pertenecientes al complejo de la Q151M, mientras que la delección  $\Delta 67$  suele estar asociada muy frecuentemente con mutaciones de resistencia a análogos a timidina, especialmente mutaciones del grupo de las TAMs2. Por todo ello, decidimos extender el estudio del papel de las delecciones en el mecanismo de escisión de iniciadores bloqueados con AZTMP y d4TMP, en RTs portadoras de TAMs.

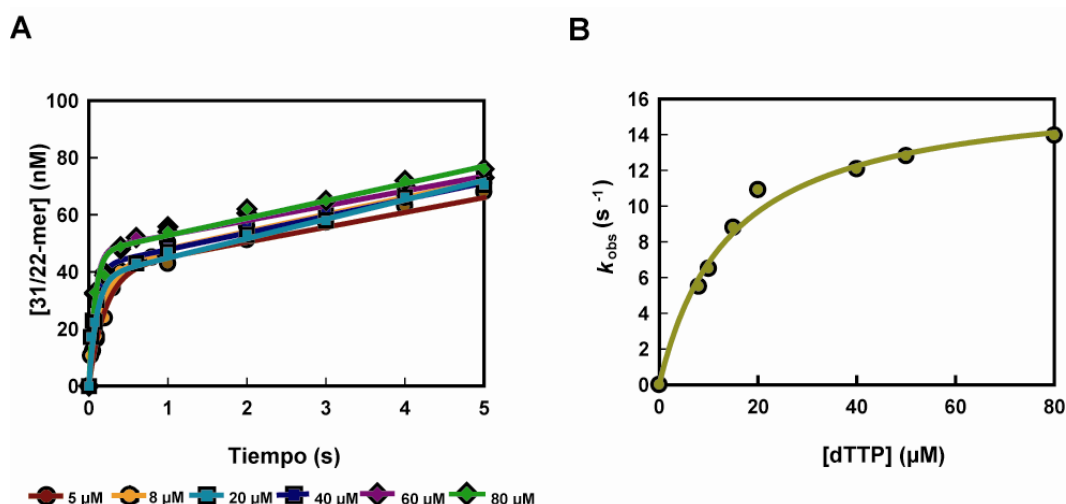




**Figura 41. Histogramas mostrando el porcentaje de mutaciones de resistencia asociadas a la delección  $\Delta 67$ .** Se muestran los porcentajes de cada mutación en las secuencias pertenecientes al Grupo 2 (A), así como las mutaciones asociadas a las secuencias del Grupo 2 que llevan la delección  $\Delta 67$  y la mutación K219Q/E (B) y la delección  $\Delta 67$  y todas las TAMs2 (C). En gris se muestra el número de secuencias pertenecientes al Grupo 2, así como el número de secuencias del subconjunto analizado para cada caso. Las mutaciones pertenecientes al complejo de la Q151M (A62V, V75I, F77L, F116Y y Q151M) se muestran en rojo. Las posiciones asociadas a mutaciones del grupo de las TAMs1 (M41L, L210W y T215Y) se muestran en amarillo y las asociadas a las TAMs2 (D67N, K70R, T215F y K219Q/E) en verde.

#### 4.3.1 Caracterización de la RT recombinante S68G/ $\Delta 69$ /K70G (G $\Delta 69$ G): Eficiencia de incorporación de dTTP y escisión de AZTMP y d4T-monofosfato (d4TMP) de iniciadores de DNA bloqueados

Si bien hemos descrito anteriormente que la delección  $\Delta 69$  disminuye la capacidad de escisión (Figura 34, 35), decidimos incluir en el estudio una RT que tuviera además las mutaciones adyacentes S68G y K70G, presentes en la secuencia de la RT del virus obtenido del paciente. El mutante denominado G $\Delta 69$ G se caracterizó mediante ensayos cinéticos de incorporación de dTTP en el estado pre-estacionario (Figura 42).

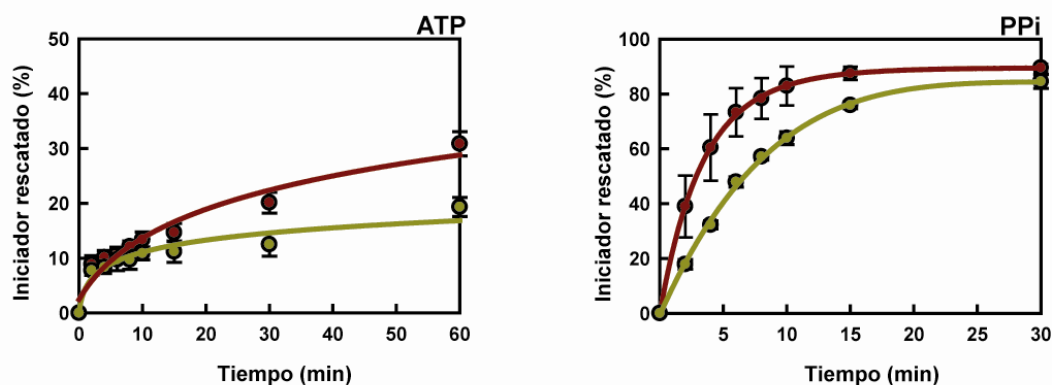


**Figura 42. Parámetros cinéticos para la incorporación de dTTP en el estado pre-estacionario con la RT mutante GΔ69G.** (A) Cinéticas de incorporación de dTTP en el estado pre-estacionario sobre un complejo molde-iniciador 31T/21P. A una mezcla preincubada de la RT (50 nM) y 31T/21P (100 nM) se le añadieron concentraciones crecientes de nucleótido en un tampón que contenía  $Mg^{2+}$  a una concentración final de 12,5 mM. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de los datos a la ecuación  $[P] = A \times (1 - e^{-k_{obs} \times t}) + k_{ss} \times t$ , para cada concentración de dNTP utilizada (B) Dependencia con la concentración de la incorporación de dTTP por la RT GΔ69G. Las constantes de velocidad ( $k_{obs}$ ) obtenidas de los ajustes de la gráfica (A) se representaron frente a la concentración de dTTP. Los datos se ajustaron a la ecuación hiperbólica  $k_{obs} = k_{pol} \times [dNTP] / (K_d + [dNTP])$ , para obtener los valores de  $k_{pol}$  y  $K_d$ . La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a la ecuación hiperbólica. Se realizaron 3 experimentos independientes y se obtuvieron valores de  $k_{pol}$  y  $K_d$  de:  $16,7 \pm 0,9 \text{ s}^{-1}$  y  $14,4 \pm 2,2 \text{ μM}$ , respectivamente.

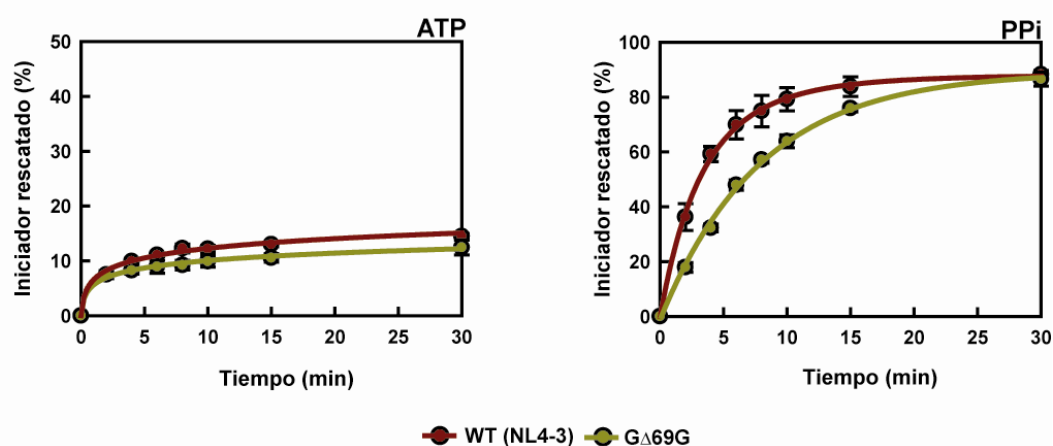
Los análisis cinéticos en el estado pre-estacionario no revelaron diferencias importantes en la eficacia catalítica ( $k_{pol}/K_d$ ) del mutante GΔ69G ( $1,15 \pm 0,19 \text{ μM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) en comparación con la RT Δ69 analizada previamente (ver **Tabla 9**). Además, el mutante GΔ69G mostró constantes cinéticas muy similares a Δ69, con una  $k_{pol}$  de  $16,7 \pm 0,9 \text{ s}^{-1}$  y una  $K_d$  de  $14,4 \pm 2,2 \text{ μM}$ .

Posteriormente se llevaron a cabo reacciones de escisión de inhibidores utilizando complejos molde-iniciador bloqueados con AZTMP y/o d4TMP en presencia de las RTs GΔ69G y WT (NL4-3) (**Figura 43**). Los resultados de los ensayos de escisión de iniciadores bloqueados con AZTMP muestran que la actividad fosforolítica del mutante GΔ69G es más baja que la de la RT WT (NL4-3), en presencia de PPI 200 μM. Además, la actividad fosforolítica es bastante reducida para las dos enzimas en presencia de ATP 3,2 mM (**Figura 43A**). Estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente con la RT Δ69 (apartado 4.2.2.2). Las cinéticas de escisión de d4TMP en presencia de PPI y ATP fueron similares a las obtenidas con iniciadores bloqueados con AZTMP, aunque el rescate en presencia de ATP fue más ineficaz (**Figura 43B**).

## A AZTTP



## B d4TTP



**Figura 43.** Cinéticas de las reacciones de escisión de iniciadores bloqueados con AZTTP (A) y d4TTP (B) para la RT WT (NL4-3) y el mutante GΔ69G. Las cinéticas de rescate se llevaron a cabo en presencia de ATP 3,2 mM (gráficas de la izquierda) y de PPi 200 μM (gráficas de la derecha). Todos los dNTPs en estos ensayos se usaron a una concentración de 100 μM, excepto el dATP cuya concentración fue de 1 μM. En estos ensayos se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA. La concentración de enzima activa en los ensayos fue de 24 y 72 nM en presencia de PPi y ATP, respectivamente. Los valores representados se obtuvieron de tres experimentos independientes.

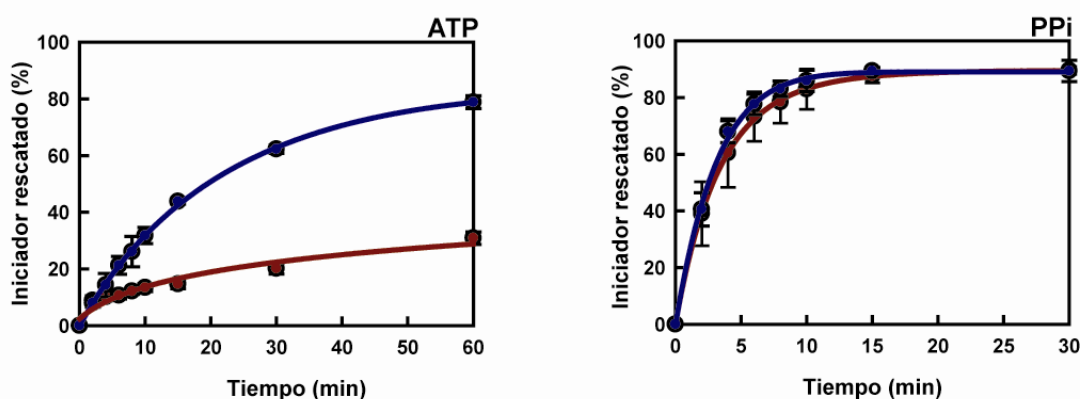
#### 4.3.2 Escisión de AZTTP y d4TTP de iniciadores de DNA bloqueados catalizada por la RT Δ67/T69G/K70R (Δ67GR)

Se analizó el efecto de la delección (Δ67) sobre la capacidad de la RT de escindir AZTTP y d4TTP de un iniciador bloqueado, en presencia de ATP y PPi. Para ello, se obtuvo el mutante Δ67GR que contiene la delección Δ67 acompañada de las mutaciones T69G y K70R. Ambas mutaciones T69G y K70R, suelen aparecer acompañando a la delección en RTs de aislados virales de pacientes tratados. Los resultados de las cinéticas de rescate se muestran en la **Figura 44**.

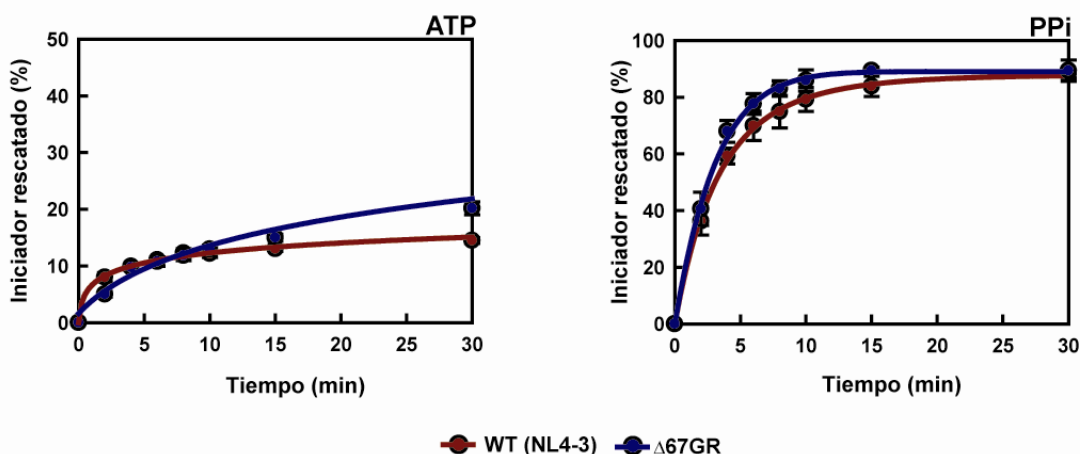
La RT WT (NL4-3) presenta una baja eficiencia de escisión sobre iniciadores bloqueados con AZT y d4T en presencia de ATP, mientras que en presencia de PPi 200

$\mu\text{M}$ , la RT WT (NL4-3) escinde eficientemente ambos inhibidores (Figura 44). La introducción de la delección  $\Delta 67$  (combinada con los cambios T69G y K70R) dio lugar a un aumento significativo en la actividad fosforolítica de la RT en presencia de ATP cuando el iniciador se encontraba bloqueado con AZTMP. El porcentaje de iniciador rescatado era 4 veces superior al obtenido con la RT WT (NL4-3) (Figura 44A). Sin embargo, estas diferencias no se observaron con iniciadores bloqueados con d4TMP, donde ambas RTs tuvieron niveles de escisión similares y bastante reducidos (Figura 44B). En ensayos de escisión dependiente de  $\text{PPi}$ , el mutante  $\Delta 67\text{GR}$  mostró una elevada actividad fosforolítica con ambos inhibidores (Figura 44).

### A AZTMP



### B d4TMP

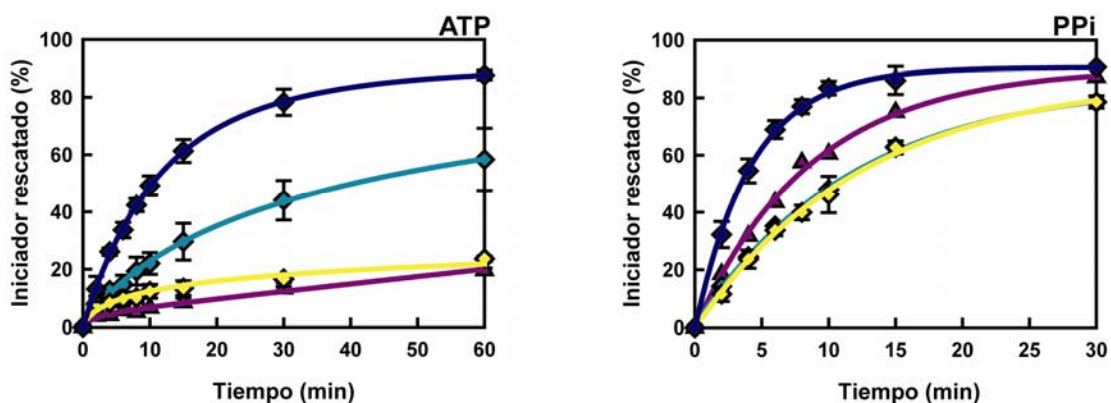


**Figura 44.** Cinéticas de las reacciones de escisión de iniciadores bloqueados con AZTMP (A) y d4TMP (B) para la RT WT (NL4-3) y la RT mutante  $\Delta 67\text{GR}$ . Las cinéticas de rescate se llevaron a cabo en presencia de ATP 3,2 mM (gráficas de la izquierda) y de  $\text{PPi}$  200  $\mu\text{M}$  (gráficas de la derecha). Todos los dNTPs en estos ensayos se usaron a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , excepto el dATP cuya concentración fue de 1  $\mu\text{M}$ . En estos ensayos se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA. La concentración de enzima en los ensayos fue de 24 y 72 nM en presencia de  $\text{PPi}$  y ATP, respectivamente. Los valores representados se obtuvieron de tres experimentos independientes.

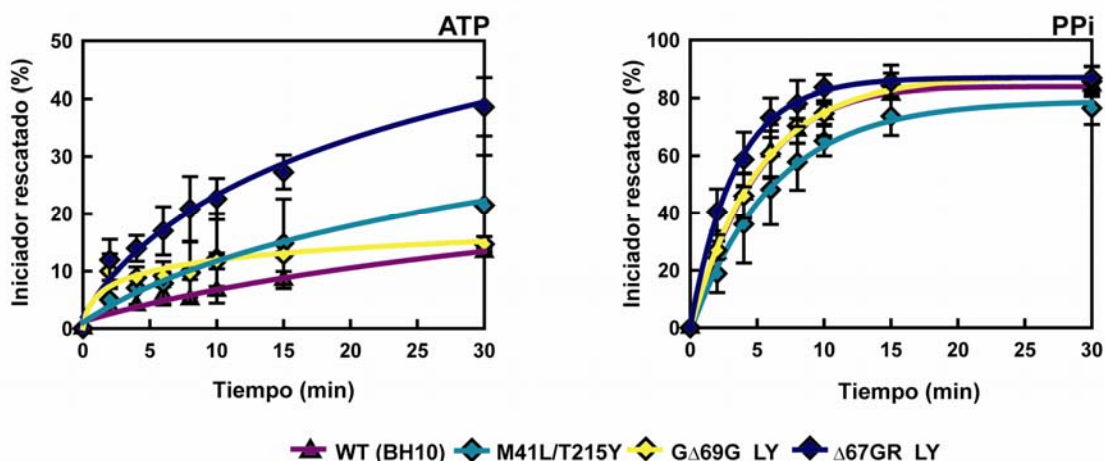
### 4.3.3 Efecto de las TAMs M41L/T215Y en la escisión de análogos a timidina catalizada por las RTs $\Delta 67$ GR y G $\Delta 69$ G

El efecto de la delección  $\Delta 69$  en la escisión también se estudió en presencia de las TAMs M41L y T215Y. Para ello, se generó una RT denominada G $\Delta 69$ G\_LY (M41L/S68G/ $\Delta 69$ /K70G/T215Y) que se analizó en comparación con la RT mutante M41L/T215Y. Del mismo modo, la RT mutante M41L/T215Y se estudió en comparación con otra RT portadora de la delección en la posición 67 y que tenía los cambios M41L/ $\Delta 67$ /T69G/K70R/T215Y, denominada  $\Delta 67$ GR\_LY. Estos cambios se introdujeron en un contexto de secuencia WT (BH10). En la **Figura 45** se muestran los resultados de los ensayos de escisión de iniciadores bloqueados con AZTMP y d4TMP, llevados a cabo con los mutantes descritos.

#### A AZTTP



#### B d4TTP



**Figura 45.** Efecto de distintas mutaciones sobre la eficiencia de escisión de iniciadores bloqueados con AZTMP (A) y d4TMP (B) en presencia de ATP o PPi. Las cinéticas de rescate se llevaron a cabo en presencia de ATP 3,2 mM (gráficas de la izquierda) y de PPi 200  $\mu$ M (gráficas de la derecha). Todos los dNTPs en estos ensayos se usaron a una concentración de 100  $\mu$ M, excepto el dATP cuya concentración fue de 1  $\mu$ M. En estos ensayos se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA. La concentración de enzima activa en los ensayos fue de 24 y 72 nM en presencia de PPi y ATP, respectivamente. Los valores representados se obtuvieron de tres experimentos independientes.

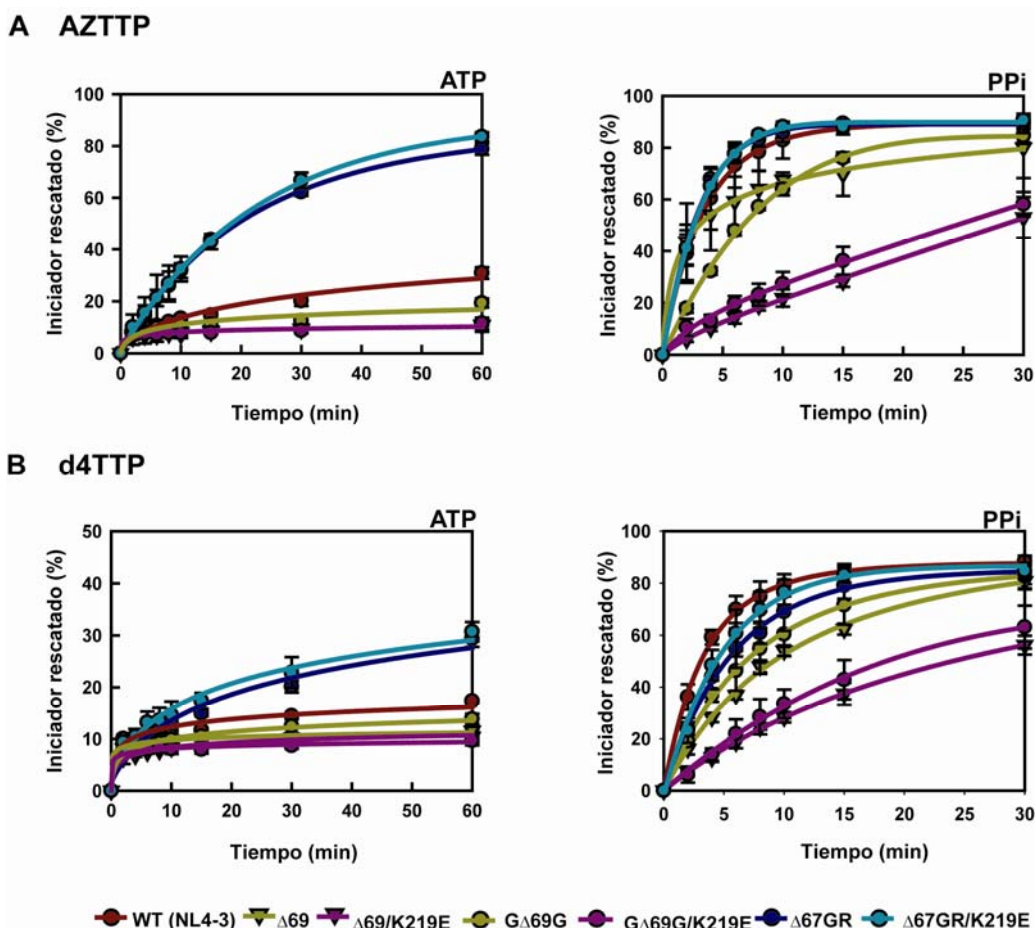
La RT WT (BH10) fue capaz de escindir iniciadores bloqueados con AZT y d4T muy eficientemente en presencia de PPi mientras que en presencia de ATP la actividad fosforolítica de la enzima fue muy baja. Por otro lado, el mutante M41L/T215Y escinde eficientemente el AZTMP en presencia de ATP y PPi (**Figura 45A**). Es interesante destacar que, cuando la delección  $\Delta 69$  se encuentra asociada a ambas TAMs (mutante G $\Delta 69$ G\_LY), la habilidad de la enzima para escindir el AZTMP en presencia de ATP se ve reducida 3 veces en relación con el mutante M41L/T215Y. Por el contrario, el mutante  $\Delta 67$ GR\_LY (M41L/ $\Delta 67$ /T69G/K70R/T215Y) incrementa considerablemente la escisión del AZTMP en presencia de ATP 3,2 mM (**Figura 45A**). Se obtuvieron resultados similares con iniciadores bloqueados con d4TMP, aunque los efectos fueron menores (**Figura 45B**). Además se observó, que en todos los casos la escisión de AZTMP fue más eficiente que la de d4TMP en presencia de ATP (**Figura 45**). Todas las enzimas escindieron eficientemente ambos inhibidores en presencia de PPi con un ligero aumento en la escisión de AZT por parte del mutante  $\Delta 67$ GR\_LY en comparación con la RT M41L/T215Y (**Figura 45**).

### **4.3.4 Papel de la mutación K219E en la escisión de AZTMP y d4TMP de iniciadores de DNA bloqueados, catalizada por RTs portadoras de las delecciones $\Delta 67$ y $\Delta 69$**

El análisis de secuencias reveló que la mayoría de las delecciones que afectan a la posición 67 llevan en su secuencia TAMs2 (en más del 64% de las ocasiones), mientras que por el contrario, las delecciones que afectan a la posición 69 (con Asp en la posición 67) las llevan en menos del 10% de las secuencias. Se introdujo la TAM2 K219E (ausente en aislados portadores de  $\Delta 69$ , y que aparece en un 48% de los que contienen  $\Delta 67$ ) en RTs mutantes portadoras de los cambios  $\Delta 69$ , S68G/ $\Delta 69$ /K70G y  $\Delta 67$ /T69G/K70R, para analizar su influencia sobre la capacidad de las RTs de escindir AZTMP y d4TMP en un iniciador bloqueado. Los resultados se muestran en la **Figura 46**.

La mutación K219E no tuvo un efecto significativo en la actividad fosforolítica dependiente de ATP cuando acompañaba a la delección  $\Delta 69$  (**Figura 46**). Los mutantes G $\Delta 69$ G/K219E (S68G/ $\Delta 69$ /K70G/K219E) y  $\Delta 69$ /K219E mostraron una baja actividad fosforolítica en presencia de ATP, similar a la observada con la enzima WT (NL4-3) y los mutantes  $\Delta 69$  y G $\Delta 69$ G (S68G/ $\Delta 69$ /K70G), en ensayos llevados a cabo con iniciadores bloqueados con AZT y d4T (**Figura 46**). Sin embargo, en presencia de PPi la mutación K219E sí alteró la eficiencia de escisión de  $\Delta 69$ . Los mutantes  $\Delta 69$ /K219E y G $\Delta 69$ G/K219E mostraron una disminución significativa en su capacidad para escindir y

extender ambos tipos de iniciadores bloqueados. Las cinéticas mostradas en la **Figura 46** muestran diferencias importantes en la velocidad de rescate de las enzimas  $\Delta 69/K219E$  y  $G\Delta 69G/K219E$ , en comparación con las correspondientes RTs portadoras de Lys en la posición 219.



**Figura 46.** Efecto de la sustitución K219E sobre la cinética de la reacción de escisión de iniciadores bloqueados con AZTMP (A) y d4TMP (B) en presencia de ATP o PPi. Las cinéticas de rescate se llevaron a cabo en presencia de ATP 3,2 mM (gráficas de la izquierda) y de PPi 200  $\mu$ M (gráficas de la derecha). Todos los dNTPs en estos ensayos se utilizaron a una concentración de 100  $\mu$ M, excepto el dATP cuya concentración fue de 1  $\mu$ M. Se utilizó el complejo molde-iniciador D38/25PGA. La concentración de enzima activa en los ensayos fue de 24 y 72 nM en presencia de PPi y ATP, respectivamente. Los valores representados se obtuvieron de tres experimentos independientes.

Por otro lado, los mutantes  $\Delta 67GR/K219E$  ( $\Delta 67/T69G/K70R/K219E$ ) y  $\Delta 67GR$  ( $\Delta 67/T69G/K70R$ ) mostraron un perfil de escisión similar en todos los casos, indicándonos que la mutación K219E no tiene una influencia significativa sobre la escisión cuando la delección  $\Delta 67$  está presente. En iniciadores bloqueados con AZT y d4T, ambos mutantes fueron capaces de escindir y extender eficientemente el iniciador en presencia de PPi (**Figura 46**). Los mutantes  $\Delta 67GR/K219E$  y  $\Delta 67GR$  rescataron ambos inhibidores más eficientemente que el resto de mutantes en presencia de ATP, con porcentajes de iniciador rescatado muy elevados para el AZT, mientras que con el d4T dichos porcentajes fueron más reducidos (**Figura 46**).





## **5.DISCUSIÓN**



## 5.1 Resistencia a efavirenz de las variantes multirresistentes, selección de mutaciones de resistencia y aparición de la delección $\Delta 69$ durante el tratamiento antirretroviral

La horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$ , formada por los residuos 63 a 73 de la RT del VIH-1, desempeña un papel importante en la estabilización del complejo dNTP/Mg<sup>2+</sup> dentro del sitio de unión del nucleótido, principalmente a través del establecimiento de enlaces de hidrógeno entre las cadenas laterales de Lys65 y Arg72 y átomos de oxígeno sustituyentes de los fosfatos  $\gamma$  y  $\beta$  del dNTP, respectivamente (Huang *et al.*, 1998). Los residuos de la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  modulan muchos aspectos de la actividad de la RT que incluyen su fidelidad de copia (Kim *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2000; Garforth *et al.*, 2007, 2010), procesividad (Arion *et al.*, 1996; Kew *et al.*, 1998), desplazamiento de cadena en la síntesis de DNA (Fisher *et al.*, 2003) y pirofosforólisis (Arion *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1999; Sluis-Cremer *et al.*, 2000). Con el aumento de la complejidad de los tratamientos antirretrovirales y del número de fármacos utilizados en las terapias actuales, se ha observado la aparición de nuevas mutaciones poco comunes, como inserciones y deleciones en la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  de la RT del VIH-1, asociadas a mutaciones que confieren resistencia a múltiples inhibidores de la RT del VIH-1 (revisado en Menéndez-Arias *et al.*, 2006).

Se han identificado dos patrones distintos de mutaciones de resistencia en aislados clínicos que contienen una delección de un aminoácido en la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  de la RT viral. Por un lado, la delección  $\Delta 67$  está comúnmente asociada a TAMs, entre las que se incluyen K70R o T215F/Y. Por otro, la delección  $\Delta 69$  se encuentra con frecuencia acompañada por el cambio Q151M y mutaciones asociadas al mismo (A62V, V75I, F77L y F116Y). En ensayos fenotípicos, los aislados multirresistentes que llevaban la delección  $\Delta 69$ , el complejo de la Q151M y las sustituciones de aminoácidos K103N, Y115F, Y181C, M184V y G190A en la región DNA polimerasa de la RT, mostraron niveles altos de resistencia a todos los inhibidores de la RT analizados en ensayos fenotípicos (ver **Figura 16** en Introducción) (Villena *et al.*, 2007). Además, el seguimiento de la población viral en el paciente permitió comprobar que la proporción de variantes portadoras de la delección  $\Delta 69$  aumentaba cuando se administraba efavirenz durante el tratamiento antirretroviral (Villena *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que en presencia de múltiples mutaciones de resistencia a NRTIs y NNRTIs, la delección  $\Delta 69$  no afecta de forma importante a la sensibilidad de la enzima al efavirenz. La resistencia elevada al efavirenz obtenida con RTs recombinantes multirresistentes (MDR\_69T, MDR\_T69A,

MDR\_Δ69 y MDR\_Δ69/S163I) fue consistente con los datos fenotípicos publicados previamente (Villena *et al.*, 2007). Nuestros resultados indican que la mutación S163I disminuye ligeramente la susceptibilidad del mutante MDR\_Δ69 a efavirenz, lo que estaría de acuerdo con los resultados de ensayos de eficacia biológica (“fitness”) realizados *in vitro*, en los que se observó que bajo presión farmacológica con efavirenz, la mutación S163I contribuye a incrementar la capacidad de replicación del virus multirresistente cuya secuencia contenía la delección Δ69 (Villena *et al.*, 2007).

Por otro lado, la mutación de resistencia a NNRTIs, K103N, incrementó de forma notable la resistencia a efavirenz, nevirapina y delavirdina de la RT recombinante, lo que está de acuerdo con resultados obtenidos en estudios publicados con anterioridad (Bacheler *et al.*, 2001; Andries *et al.*, 2004). La mutación K103N es muy importante para la adquisición de niveles altos de resistencia a nevirapina y delavirdina en las RTs multirresistentes, al presentar un valor de  $CI_{50}$  para ambos inhibidores superior a 1,6 mM. Sin embargo, la  $CI_{50}$  obtenida con la RT K103N para efavirenz (26,6 μM) fue al menos 60 veces inferior a la de las enzimas multirresistentes ( $CI_{50} > 1,6$  mM), lo que sugiere que otras mutaciones, tales como Y181C y G190A, implicadas en resistencia a NNRTIs (Johnson *et al.*, 2009; Reuman *et al.*, 2010) contribuyen a alcanzar la elevada resistencia a efavirenz observada con las RTs recombinantes multirresistentes. Tanto Tyr181 como Gly190 se encuentran dentro en el bolsillo de unión de los NNRTIs (Ren *et al.*, 2000; Lindberg *et al.*, 2002; Sarafianos *et al.*, 2004). La estructura cristalográfica de la RT mutante Y181C unida a efavirenz, (Ren *et al.*, 2001) demuestra que el cambio de Tyr181 por Cys genera una pérdida de la interacción hidrofóbica del residuo aromático (Tyr) con el efavirenz, lo que provoca una alteración en la colocación del inhibidor en el sitio de unión de NNRTIs. Por otro lado, el cambio de Gly190 por Ala, introduce un grupo metilo ( $CH_3$ ) en la cadena lateral del aminoácido que provoca conflictos estéricos en la interacción del inhibidor con la RT, alterando su afinidad por la enzima (Sarafianos *et al.*, 2004).

Dado que la RT portadora de la delección Δ69 se selecciona con tratamientos que contienen efavirenz y que este inhibidor potencia las interacciones entre las subunidades p66 y p51 de la RT del VIH-1 (Tachedjian *et al.*, 2001; Tachedjian y Goff, 2003), asumimos que la delección estaría jugando un papel importante en la dimerización de la enzima. En ensayos de estabilidad en presencia de urea, no se observaron diferencias significativas entre las enzimas multirresistentes y la RT WT (NL4-3), aunque la RT MDR\_Δ69 fue ligeramente más estable que la RT MDR\_69T (**Figura 27**). Sin embargo, en estos ensayos no sólo medimos efectos sobre interacción entre las subunidades p66 y

p51 de la RT, sino que los valores de  $CI_{50}$  para urea obtenidos se ven influidos por la interacción de la RT con el DNA. En este trabajo observamos que la mutación K103N produce un incremento de 3 veces en la constante de asociación de la RT con el complejo molde-iniciador. El efecto de K103N u otras mutaciones sobre la unión de complejos DNA/DNA puede enmascarar los efectos derivados de la interacción de las subunidades p66 y p51, haciendo difícil la evaluación del impacto de  $\Delta 69$  sobre dichas interacciones.

Ensayos fenotípicos llevados a cabo previamente (Villena *et al.*, 2007) demostraron que los virus resistentes a múltiples inhibidores de la RT presentaban hipersensibilidad a los inhibidores de la PR, sugiriendo la existencia de un cierto desequilibrio entre los niveles de PR y RT en el virión. Estudios anteriores han demostrado que mutaciones en la RT pueden afectar a la estabilidad de la enzima, debido a una alteración en su capacidad para formar el heterodímero (Mulky *et al.*, 2005) o a su mayor susceptibilidad a la degradación por la PR viral (Olivares *et al.*, 2007). En este último caso, mutaciones en la PR, generadas tras sucesivos pases del virus *in vitro*, pueden contrarrestar esta deficiencia (Olivares *et al.*, 2007). Todos los virus recombinantes utilizados en el estudio de Villena *et al.* (2007) tenían la misma secuencia en la PR (que era la derivada de VIH-1<sub>NL4-3</sub>). Villena *et al.* llevaron a cabo experimentos para determinar si el incremento de susceptibilidad a inhibidores de la PR podría estar relacionado con la maduración del virus. En estos estudios se observó que los viriones obtenidos de células infectadas con el virus multirresistente del paciente mostraban cierta disminución en los niveles de procesamiento de Gag, lo que estaría de acuerdo con la presencia de una menor cantidad de PR activa en el virión (Villena *et al.*, 2007). Por todo ello, no podemos descartar que las RTs multirresistentes lleven en su secuencia mutaciones que disminuyan la expresión de la PR viral debido a un defecto en la dimerización de la poliproteína Gag-Pol, o a su menor estabilidad.

## **5.2 Efecto de mutaciones en el subdominio “connection” sobre la resistencia a NNRTIs: Análisis del papel de A376S en la resistencia a nevirapina**

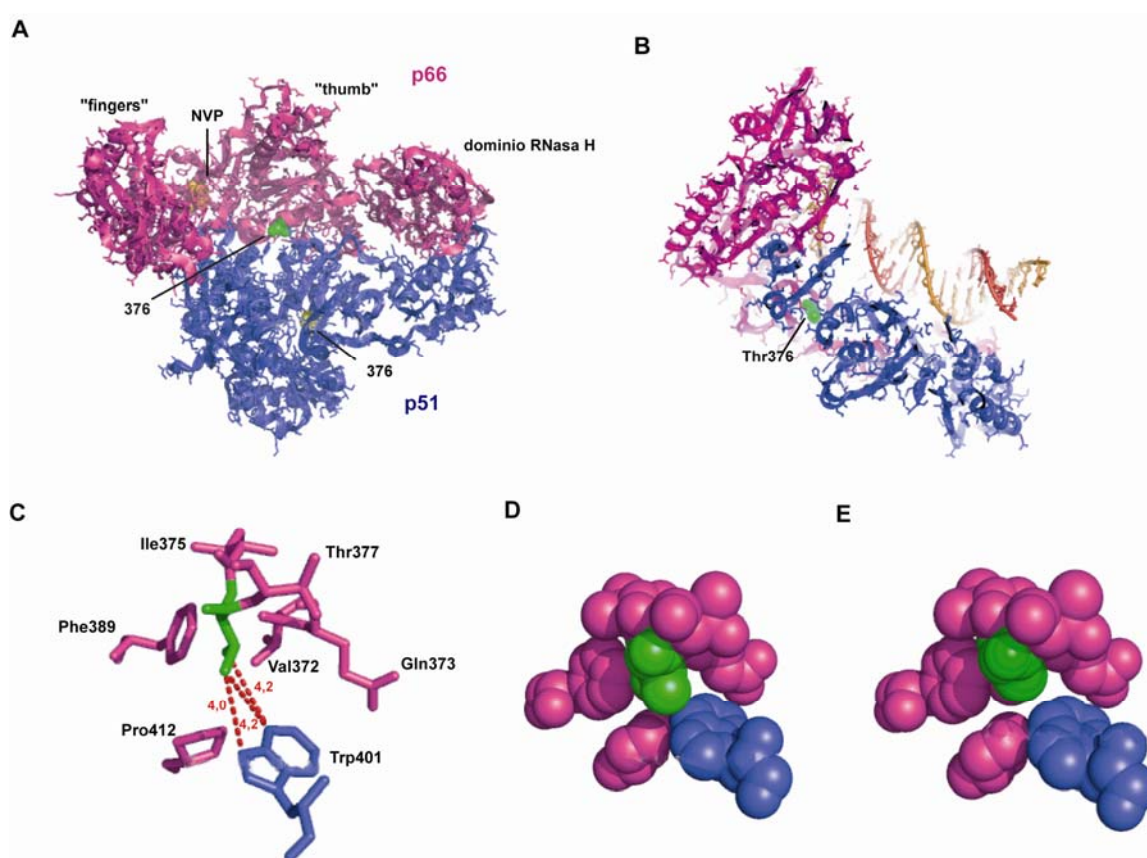
Estudios anteriores han sugerido que las mutaciones dentro del subdominio “connection” y el dominio RNasa H de la RT podrían modular la resistencia a NNRTIs a través de varios mecanismos moleculares que incluyen alteraciones en: (1) la dimerización de p66/p51 (Gupta *et al.*, 2010); (2) la actividad RNasa H de la enzima

durante el inicio de la retrotranscripción (Biondi *et al.*, 2010) o durante la elongación de complejos RNA/DNA a lo largo del proceso (Nikolenko *et al.*, 2010); y (3) la afinidad de la enzima por el inhibidor (Schukmann *et al.*, 2010). Aunque los residuos 248-560 (pertenecientes a los subdominios “thumb” y “connection” y al dominio RNasa H) de las RTs multirresistentes utilizadas en este trabajo contenían la secuencia de la RT WT (NL4-3), estudios anteriores han sugerido que en la RT multirresistente podría haber una interacción funcional entre la región polimerasa y la región C-terminal de la subunidad p66 (que incluiría el subdominio “connection” y el dominio RNasa H) (Nikolenko *et al.*, 2007; Yap *et al.*, 2007). Reforzando esta idea, los estudios llevados a cabo con clones virales del aislado clínico, portadores de los residuos 15-527 de la RT multirresistente, demostraron que la presencia de los aminoácidos 248-527 era necesaria para generar virus con una capacidad replicativa elevada, consistente con las fluctuaciones observadas *in vivo* en las poblaciones virales del paciente (Villena *et al.*, 2007).

Debido a que la mayor parte de las mutaciones de resistencia a NRTIs y NNRTIs se localizan en el dominio polimerasa de la RT (Johnson *et al.*, 2009), los análisis de genotipado no incluyen mutaciones fuera de esta región. Sin embargo, las mutaciones en el subdominio “connection” y el dominio RNasa H pueden contribuir significativamente a la resistencia a inhibidores de la RT, tanto individualmente (Yap *et al.*, 2007; Hachiya *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2010; Puertas *et al.*, 2010) como cuando se encuentran asociadas a mutaciones de resistencia a inhibidores de la RT (Nikolenko *et al.*, 2007; Yap *et al.*, 2007), por lo que son varios los autores que sugieren extender el genotipado más allá del subdominio “thumb” de la polimerasa (Götte, 2007; Santos *et al.*, 2008).

Una de las mutaciones localizadas fuera del dominio DNA polimerasa de la RT es A376S, que se encuentra en el subdominio “connection” de la enzima. Este cambio aparece en algunos aislados portadores de combinaciones de mutaciones similares a las que encontramos en las enzimas multirresistentes, que incluyen: el complejo de la Q151M, K103N, Y181C, M184V, G190A y la delección  $\Delta 69$  (Gómez-Carrillo *et al.*, 2004; Baxter *et al.*, 2006; Laurent *et al.*, 2006; Sylla *et al.*, 2008). Ensayos fenotípicos llevados a cabo con clones del VIH-1 portadores de A376S en la RT mostraron un incremento de 3,7 veces en la  $CI_{50}$  para nevirapina (Hachiya *et al.*, 2009). Este resultado fue consistente con los obtenidos en este trabajo utilizando la RT recombinante A376S, donde demostramos que el cambio A376S incrementa en 4 veces la  $CI_{50}$  para el inhibidor, lo que se vio confirmado además por una disminución de 3 veces en la afinidad de la RT A376S por nevirapina (**Figura 30**).

La base estructural que justificaría el papel de la mutación A376S sobre la resistencia a nevirapina no se conoce. En general, la resistencia a NNRTIs implica la pérdida de interacciones entre el fármaco y los aminoácidos del sitio de unión de NNRTIs. Sin embargo, la distancia entre el aminoácido de la posición 376 y el bolsillo de unión de NNRTIs es mayor de 20 Å, de modo que la resistencia a nevirapina no se puede atribuir a una interacción directa entre el aminoácido 376 y el inhibidor (**Figura 47**). Los resultados de las determinaciones de constantes de afinidad de la RT A376S por el DNA demostraron que la mutación A376S produce un incremento en la constante de asociación de la RT con el complejo molde-iniciador. Este incremento de afinidad podría atribuirse en parte a una mayor estabilización del heterodímero de la RT.



**Figura 47. Localización estructural de Thr376 en la RT del VIH-1.** (A) Estructura cristalográfica de la RT del VIH-1 unida a nevirapina (NVP) mostrando la ubicación de la posición 376 en p66 (en rosado) y p51 (en azul). (B) Localización de la Thr-376 en p66 (señalada y en verde) relativa al complejo molde-iniciador en el complejo ternario de la RT que contiene un complejo molde-iniciador y dTTP (C) Residuos de aminoácidos próximos a Thr376 en p66 en el complejo ternario de la RT del VIH-1 (RT/DNA-DNA/dTTP). Los residuos mostrados se encuentran a menos de 5 Å de distancia de Thr376 (en verde). Los residuos de p66 se muestran en rosado y Trp401 de p51, azul. Las distancias interatómicas relevantes se muestran en rojo. (D) y (E) son modelos que muestran las interacciones representadas en el panel (C). El panel (E) muestra un modelo en donde Thr376 ha sido reemplazada por Ala. Las posiciones relativas de los residuos mostrados en los paneles (C-E) corresponden a la orientación de la RT mostrada en el panel (B). Las coordenadas han sido obtenidas del Protein Data Bank (código 3HVT para (A) y (B), y código 1RTD para (C), (D) y (E)) (Smerdon *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1998). Esta figura se ha realizado con el programa “PyMOL Molecular Graphics System” (DeLano Scientific).

El residuo 376 de la RT es un residuo polimórfico en el VIH-1 grupo M subtipo B. Más del 60% de los aislados virales de dicho subtipo (obtenidos de pacientes no tratados) contienen Ala en la posición 376, mientras que un 24% contiene Thr y un 6% Ser (base de datos de Stanford; <http://hivdb.stanford.edu>). Todas las coordenadas cristalográficas depositadas en el “Protein Data Bank” (PDB) correspondientes a RTs se obtuvieron con enzimas derivadas de la cepa HXB2 del VIH-1, que contiene Thr en la posición 376. La estructura cristalográfica del complejo ternario RT/DNA-DNA/dTTP indica que en la subunidad p66, la Thr376 de la RT del VIH-1 se localiza cerca de la interfase de dimerización de p66/p51 y podría influir en la susceptibilidad de la RT a nevirapina, a través de un efecto sobre la formación del heterodímero (**Figura 47B**). Thr376 interacciona con Gln373 y Trp401, residuos que se encuentran en la superficie de la región de interacción entre p66 y p51 (Menéndez-Arias *et al.*, 2001) (**Figura 47**). La distancia interatómica entre las cadenas laterales de Thr376 y Trp401 en el complejo ternario de la RT es de 4.2 Å, indicándonos que es posible que la mutación A376S favorezca el empaquetamiento de las cadenas laterales de Trp401 y Ser/Thr376, lo que aumentaría la estabilidad de la enzima (**Figura 47**). Una mayor estabilidad de p66/p51 haría necesaria una mayor cantidad de nevirapina para alterar la unión de la RT al complejo molde-iniciador DNA/DNA, de modo que el complejo binario ya no retuviera su funcionalidad, lo que explicaría el incremento de  $CI_{50}$  observado en nuestros experimentos.

### 5.3 Determinantes moleculares de la resistencia al AZT en RTs multirresistentes portadoras de la delección $\Delta 69$

El AZTTP es un sustrato incorporado ineficazmente por las RTs multirresistentes. La baja eficacia catalítica de incorporación de AZTTP de estas enzimas puede atribuirse a la presencia de las 5 mutaciones que forman el complejo de la Q151M (A62V/V75I/F77L/F116Y/Q151M), aunque bajo condiciones de estado estacionario las RTs multirresistentes mostraron una mayor resistencia al inhibidor que la RT portadora del complejo. Un análisis amplio de los efectos de la delección sobre la discriminación entre AZTTP y dTTP en el contexto de secuencia de las RTs multirresistentes no fue posible debido a la elevada resistencia intrínseca al inhibidor de estas enzimas, reflejada en el alto valor de la constante de disociación ( $K_d$ ) para el AZTTP ( $>40 \mu M$ ). Sin embargo, nuestros datos mostraron que en RTs multirresistentes, la presencia o ausencia de la delección no afectaba de forma importante a la eficacia catalítica de incorporación de AZT, cuando ésta se medía en condiciones de estado estacionario.



La adquisición de resistencia a AZT a través de las mutaciones del complejo de la Q151M (A62V/V75I/F77L/F116Y/Q151M) implica alteraciones en la capacidad de la enzima para discriminar entre AZTTP y dTTP, sin intervención del mecanismo de escisión mediado por ATP o PPi (Deval *et al.*, 2002). Al igual que la RT portadora del complejo de la Q151M, las RTs multirresistentes mostraron una actividad fosforolítica muy reducida en la escisión de AZTMP. Estudios anteriores realizados en el laboratorio, demostraron que la mutación accesoria del complejo de la Q151M, V75I, disminuye la escisión de AZTMP en distintos contextos de secuencia (Matamoros *et al.*, 2009). Sin embargo, la reversión de Ile a Val75 no modificó los niveles de escisión de las variantes multirresistentes utilizadas en este trabajo. Otras mutaciones tales como Y181C y M184V, que reducen la pirofosforólisis en presencia de iniciadores bloqueados con AZT (Götte *et al.*, 2000; Selmi *et al.*, 2003) podrían contribuir también a los bajos niveles de escisión observados.

#### **5.4 Resistencia a 3TC e hipersensibilidad al AZT conferida por la delección $\Delta 69$ en ausencia de mutaciones de resistencia a NRTIs y NNRTIs**

La introducción de la delección de Thr69 ( $\Delta 69$ ) en la RT, en el contexto de secuencia de un virus no mutado (WT), dio lugar a una variante del VIH-1, cuya  $CI_{50}$  para 3TC y FTC era 3,5 a 5 veces superior a la del virus WT (VIH-1<sub>NL4-3</sub>) en ensayos fenotípicos (Villena *et al.*, 2007). Los datos presentados en este trabajo, basados en ensayos cinéticos llevados a cabo en el estado pre-estacionario con RTs recombinantes, indican que la resistencia a 3TC mediada por la delección  $\Delta 69$ , se debe a una reducción de 7 veces aproximadamente en la capacidad de la enzima para discriminar entre dCTP y 3TCTP. Esta reducción fue debida a una disminución en la constante catalítica y a una pérdida de afinidad de la enzima por el inhibidor, efecto que se había visto previamente con RTs que contenían la mutación de resistencia M184V (Deval *et al.*, 2005). Bajo nuestras condiciones de ensayo, la escisión de 3TCMP por parte de las RTs mutantes utilizadas fue muy ineficiente, lo que no constituye una sorpresa, ya que se sabe que en general los análogos a citidina son malos sustratos para la reacción de escisión mediada por ATP (Isel *et al.*, 2001; Mas *et al.*, 2002).

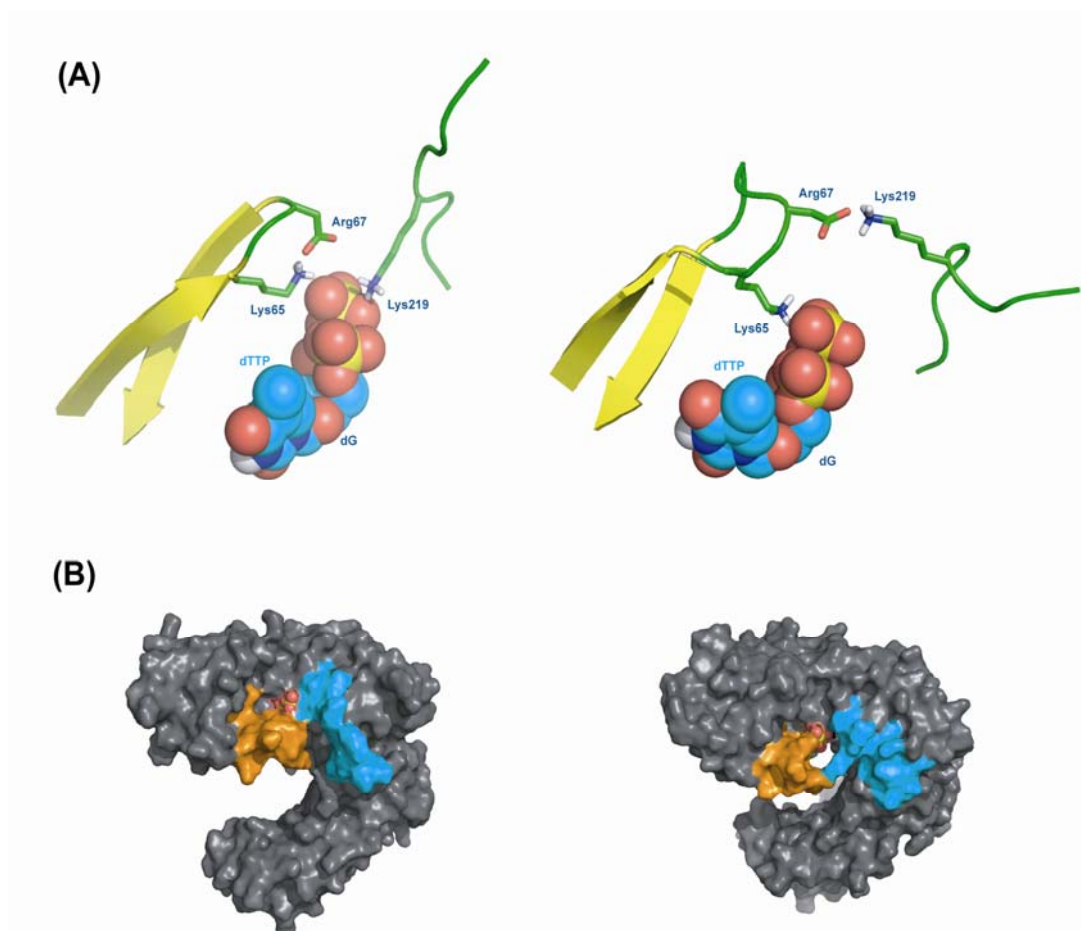
En ensayos fenotípicos se vio que por sí sola la delección  $\Delta 69$  aumentaba aproximadamente 5 veces la sensibilidad al AZT del VIH-1 (Villena *et al.*, 2007; **Tabla 15**). Los estudios bioquímicos realizados revelaron que estas diferencias no pueden ser atribuidas a una disminución en la eficacia relativa de incorporación de AZTTP frente a dTTP, sino a la menor actividad fosforolítica dependiente de ATP y PPi de la RT

portadora de la delección. Se ha estimado que la concentración de ATP en diversos tipos de células (células H9, macrófagos, linfocitos activados y no activados, etc.) es de 1-5 mM (De la Rosa et al., 1991; Gribble *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2005). Nuestros resultados demuestran que en comparación con la RT WT (NL4-3), la RT  $\Delta 69$  escinde peor el AZTMP de iniciadores bloqueados en presencia de concentraciones fisiológicas de ATP (3,2 mM). Por otro lado, la RT  $\Delta 69$  mostró una velocidad de escisión de AZTMP dos veces menor que las obtenidas con la RT WT (NL4-3) y la RT mutante T69A, en un amplio rango de concentraciones de PPi (6-500  $\mu$ M). Estos datos nos sugieren que la hipersensibilidad al AZT podría ser observada no sólo en linfocitos activados, en los que la concentración de PPi estimada se encuentra dentro de un rango de 55 a 400  $\mu$ M (Barshop et al., 1991; Smith *et al.*, 2005), sino también en macrófagos y células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> no estimuladas, donde la concentración de PPi se estima en aproximadamente 7 a 15  $\mu$ M (Smith *et al.*, 2005). Los cambios S68G y K70G, asociados a  $\Delta 69$  y presentes en el aislado viral del paciente (**Figura 15**; Villena et al., 2007), no influyeron en los efectos producidos por la delección  $\Delta 69$ , ni en ensayos de escisión de AZT ni en ensayos de incorporación de dTTP.

### 5.5 Efectos potenciales de la delección $\Delta 69$ sobre la estructura de la RT del VIH-1: Implicaciones en resistencia

El modelo molecular de la RT  $\Delta 69$  unida a un complejo molde-iniciador y a un dNTP entrante (**Figura 48**) sugiere que la delección no afecta a interacciones críticas, requeridas para el ataque nucleofílico entre el grupo hidroxilo (3'OH) del iniciador y el fosfato  $\alpha$  del dNTP entrante. Por ello, no es sorprendente que la RT mutante presente una elevada eficacia catalítica de incorporación de nucleótido. Sin embargo, las mayores diferencias entre la estructura modelada de la RT  $\Delta 69$  y la estructura cristalográfica de la RT WT del VIH-1 se observan en la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  (residuos 63-73) y en las posiciones relativas de las cadenas  $\beta 11a$  (residuos 214-217) y  $\beta 12$  (residuos 227-229). De acuerdo con el modelo, la pérdida de Thr69 conlleva la extensión de las cadenas  $\beta 3$  y  $\beta 4$ , que podría ocasionar un incremento en la estabilidad de la horquilla y reducir su flexibilidad conformacional (**Figura 48**). Además, la cadena polipeptídica entre los residuos 217 y 227 se desplazaría hacia el sitio de unión del dNTP, permitiendo que la cadena lateral de la Lys219 interaccionase con átomos de oxígeno sustituyentes del fosfato y del dNTP entrante. El puente salino entre las cadenas laterales de Asp67 y Lys219, que se observa en la estructura cristalográfica de la RT WT del VIH-1, se pierde en el modelo de la RT  $\Delta 69$ , de tal manera que la cadena lateral de Asp67 podría interferir ahora en la interacción de Lys65 con el dNTP entrante (**Figura 48**). La pérdida de la

interacción de la Lys65 y el dNTP sugerida por el modelo, explicaría por qué K219E o K219Q (dos TAMs que aparecen en aislados de pacientes tratados) no se asocian con la delección  $\Delta 69$  (Figura 41A).



**Figura 48. Comparación del modelo estructural de la RT mutante  $\Delta 69$  y la estructura cristalográfica de la RT WT.** (A) Representación de la cadena polipeptídica en forma de cinta de los residuos 63-73 y 214-228 en el modelo estructural de la RT  $\Delta 69$  (izquierda) y en la estructura cristalográfica del complejo ternario que contiene la RT WT del VIH-1, un molde-iniciador DNA/DNA y un nucleótido entrante (derecha). Las cadenas laterales de Lys65, Arg67 y Lys219 se representan en verde. El nucleótido entrante (dTTP) y el nucleótido en el extremo 3' del iniciador se representan con un modelo de esferas. (B) Vista de la superficie del modelo molecular de la RT  $\Delta 69$  (izquierda) y la estructura cristalográfica de la RT WT del VIH-1 (derecha), mostrando la ubicación de los residuos 63-73 (naranja) de la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  y los residuos 214-228 (verde). El dNTP entrante (parcialmente cubierto por las estructuras coloreadas) se representa con un modelo de esferas. En ambos casos, se utiliza la numeración de secuencia de la RT WT. Figura obtenida a partir de las coordenadas del modelo molecular de la RT  $\Delta 69$  generado por el Dr. Jesús Mendieta y las coordenadas cristalográficas del complejo ternario de la RT del VIH-1 (1RTD, Huang *et al.*, 1998).

Nuestros resultados mostraron que la delección  $\Delta 69$  no tiene un efecto significativo sobre la resistencia a foscarnet, ni en reacciones de polimerización llevadas a cabo con la enzima recombinante, ni en ensayos fenotípicos en los que se utilizaron cepas del VIH-1 portadoras de la delección (Figura 49). Los datos fenotípicos fueron consistentes con los obtenidos en los ensayos de  $CI_{50}$  realizados en este trabajo. Es interesante destacar que a concentraciones elevadas de foscarnet, este análogo de PPI es capaz de eliminar el

AZTMP de iniciadores bloqueados con el inhibidor (Cruchaga *et al.*, 2006). Bajo nuestras condiciones de ensayo, las tasas de escisión en presencia de foscarnet ( $k_{es}$ ) mostradas por la RT WT (NL4-3) y por las RTs mutantes  $\Delta 69$  y T69A fueron similares, pero muy inferiores (aproximadamente 1000 veces) a las obtenidas con PPI. En comparación con el PPI, el foscarnet tiene un menor volumen (Figura 40B), y por lo tanto, los efectos estéricos que afectan la interacción con las cadenas laterales de Lys65 y Lys219 se verían reducidos.

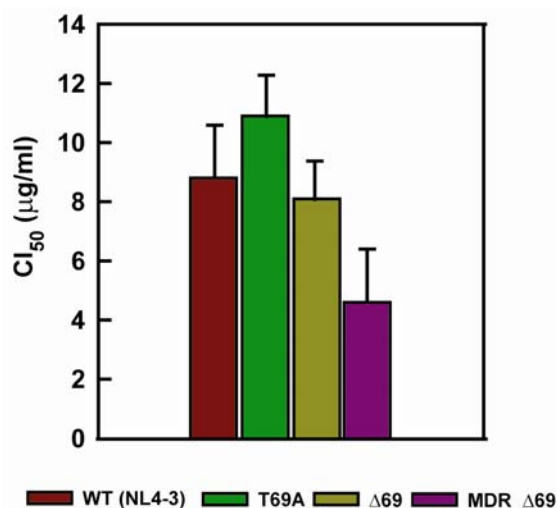


Figura 49. Histogramas mostrando la CI<sub>50</sub> de foscarnet para las RTs WT (NL4-3), T69A,  $\Delta 69$  y MDR\_ $\Delta 69$ . Los valores de CI<sub>50</sub> representan el valor medio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos, cada uno de ellos realizado seis veces. [Datos proporcionados por el Dr. Miguel Ángel Martínez (Fundación irsiCaixa, Badalona)]

La delección  $\Delta 69$  dificulta la escisión, y esto probablemente se debe a que se producen alteraciones en las interacciones con el grupo fosfato del PPI, localizado en una posición distal en relación con el extremo 3' del iniciador. Reordenamientos estructurales a nivel local, que incluyen cambios conformacionales predichos por el modelo molecular (Figura 48) y que afectan a las cadenas  $\beta 3$ - $\beta 4$  y  $\beta 11a$ - $\beta 12$  y a los bucles comprometidos entre ellas, también podrían reducir la accesibilidad del donante de PPI al nucleótido terminador de cadena, ubicado en el extremo 3' del iniciador.

El modelo molecular de la RT portadora de la delección  $\Delta 69$  sugiere que las interacciones que implican a las cadenas laterales de Asp67 y Lys219 podrían jugar un papel importante en la hipersensibilidad al AZT mediada por la delección  $\Delta 69$ . Los resultados aquí presentados demuestran que en presencia de PPI, la sustitución de la Lys219 por Glu disminuye la escisión de análogos a timidina (AZT, en mayor medida que d4T) cuando la mutación K219E se encuentra acompañada de la delección  $\Delta 69$ .

El acceso del donador de PPi al inhibidor que bloquea el extremo 3' del iniciador en la RT portadora de la delección  $\Delta 69$  posiblemente se ve más afectado por la presencia de Glu219 en lugar de Lys, ya que el cambio K219E modifica la carga y el tamaño de dicho residuo. Además, esta mutación podría estar influyendo en el posicionamiento correcto del iniciador bloqueado por el inhibidor, alterando la orientación adecuada para el ataque nucleofílico requerido para la escisión del fármaco. Apoyando esta hipótesis, los ensayos fenotípicos de susceptibilidad a AZT muestran una reducción de la sensibilidad al AZT como consecuencia de la introducción de la mutación K219E en la secuencia de la RT portadora de la delección  $\Delta 69$  (Tabla 15).

**Tabla 15. Susceptibilidad a AZT y d4T en virus recombinantes portadores de variantes de la RT.**

| Enzimas             | CI <sub>50</sub> (ng/ml) |                     |
|---------------------|--------------------------|---------------------|
|                     | AZT                      | d4T                 |
| WT (NL4-3)          | 1,5 ± 0,3                | 61,6 ± 10,0         |
| T69A                | 0,9 ± 0,1 (0,6x)         | -                   |
| MDR_Δ69             | >1 (>1,000x)             | -                   |
| Δ69                 | 0,26 ± 0,1 (0,17x)       | -                   |
| Δ69/K219E           | 0,65 ± 0,1 (0,43x)       | 66,0 ± 19,7 (1,1x)  |
| S68G/Δ69/K70G       | 1,0 ± 0,3 (0,7x)         | 66,2 ± 18,8 (1,1x)  |
| S68G/Δ69/K70G/K219E | 2,1 ± 0,3 (1,4x)         | 88,5 ± 24,9 (1,4x)  |
| Δ67/T69G/K70R       | 12,6 ± 1,7 (8x)          | 101,3 ± 13,5 (1,6x) |
| Δ67/T69G/K70R/K219E | 15,4 ± 6,5 (10x)         | 87,6 ± 24,5 (1,4x)  |

Los valores de CI<sub>50</sub> representan el valor medio ± la desviación estándar de tres ensayos, cada uno de ellos realizado seis veces. Entre paréntesis se indica el aumento (en nº de veces) de la CI<sub>50</sub> para el inhibidor con respecto al virus control que lleva la RT WT (NL4-3) [Datos proporcionados por el Dr. Miguel Ángel Martínez (Fundación irsiCaixa, Badalona)].

## 5.6 Influencia de las RTs S68G/Δ69/K70G (GΔ69G) y Δ67/T69G/K70R (Δ67GR) en la actividad fosforolítica de la RT portadora de las TAMs M41L y T215Y

La reciente determinación de la estructura cristalográfica de una RT portadora de las TAMs M41L/D67N/K70R/T215Y/K219Q unida a AZTp<sub>4</sub>A ha revelado que estas mutaciones estarían generando un sitio de unión para el ATP, ausente en la RT WT (Tu *et al.*, 2010). En ese estudio se observó que todas las TAMs a excepción de M41L estarían rodeando la porción adenosina monofosfato (AMP) del AZTp<sub>4</sub>A unido, estableciendo interacciones, especialmente con los residuos Arg70 y Tyr215, que aumentarían la estabilidad de la unión de AMP a la RT resistente. Estos resultados

confirman la hipótesis propuesta a partir de estudios de modelado molecular, que había llevado a algunos autores a sugerir que la Tyr215 podría participar en la unión del ATP, facilitando así la escisión de análogos a nucleósido de iniciadores bloqueados, cuando el extremo 3' del iniciador se encontrara en el sitio N (Boyer *et al.*, 2001; Sarafianos *et al.*, 2002). La delección  $\Delta 67$  podría actuar como una mutación secundaria en este contexto. El análisis de secuencias llevado a cabo en este trabajo indica que la delección  $\Delta 67$  se presenta frecuentemente asociada con TAMs (**Figuras 40 y 41**).

Se ha demostrado que la RT portadora de las TAMs M41L y T215Y incrementa significativamente la actividad fosforolítica dependiente de ATP sobre iniciadores bloqueados con AZTMP y levemente sobre iniciadores bloqueados con d4T (Betancor *et al.*, 2010). Ensayos fenotípicos llevados a cabo con virus recombinantes portadores de la RT M41L/T215Y mostraron que estos cambios producían un incremento de 4 veces en la  $CI_{50}$  para el AZT, sin alterar de forma significativa la resistencia a d4T (**Tabla 16**). Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en este trabajo, ya que la escisión dependiente de ATP de iniciadores bloqueados con análogos a timidina por parte de la RT M41L/T215Y se vio incrementada, con respecto a la presentada por la RT WT (BH10). Además, los niveles de escisión observados fueron mayores sobre iniciadores bloqueados con AZTMP que sobre iniciadores bloqueados con d4TMP. Por otro lado, en este trabajo no observamos diferencias significativas en la escisión de iniciadores bloqueados con AZTMP o d4TMP en presencia de PPi, entre las RTs mutantes y la RT WT (BH10) (**Figura 45**). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en trabajos anteriores, en los que las diferencias en los niveles de actividad fosforolítica dependiente de PPi entre las RTs portadoras de TAMs y la RT WT fueron relativamente pequeñas (Arion *et al.*, 1998) o no significativas (Carroll *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1999; Ray *et al.*, 2003).

La introducción de la delección  $\Delta 69$  y sus dos cambios acompañantes S68G y K70G tiene un efecto antagónico significativo sobre la escisión, en presencia de las TAMs M41L y T215Y. Este efecto se observó en reacciones de escisión llevadas a cabo con iniciadores bloqueados con AZTMP en presencia de ATP y se ve refrendado por los resultados de los ensayos fenotípicos, en los que se vio que la introducción de los cambios S68G/ $\Delta 69$ /K70G en la RT M41L/T215Y aumentaba su sensibilidad al AZT (**Tabla 16**).

**Tabla 16. Susceptibilidad a AZT y d4T en virus recombinantes portadores de variantes de la RT.**

| Enzimas                  | CI <sub>50</sub> (ng/ml) |                 |
|--------------------------|--------------------------|-----------------|
|                          | AZT                      | d4T             |
| WT (BH10)                | 1,5 ± 0,7                | 79 ± 20         |
| M41L/T215Y               | 6,1 ± 2,0 (3,8x)         | 92 ± 17 (1,2x)  |
| S68G/Δ69/K70G/M41L/T215Y | 1,6 ± 0,8 (1,1x)         | 87 ± 48 (1,1x)  |
| Δ67/T69G/K70R/M41L/T215Y | 8,2 ± 5,9 (5,5x)         | 113 ± 76 (1,4x) |

Los valores de CI<sub>50</sub> representan el valor medio ± la desviación estándar de tres ensayos, cada uno de ellos realizado seis veces. Entre paréntesis se indica el aumento (en nº de veces) de la CI<sub>50</sub> para el inhibidor con respecto al virus control que lleva la RT WT (BH10). [Datos proporcionados por el Dr. Miguel Ángel Martínez (Fundación irsiCaixa, Badalona); Betancor *et al.*, 2010].

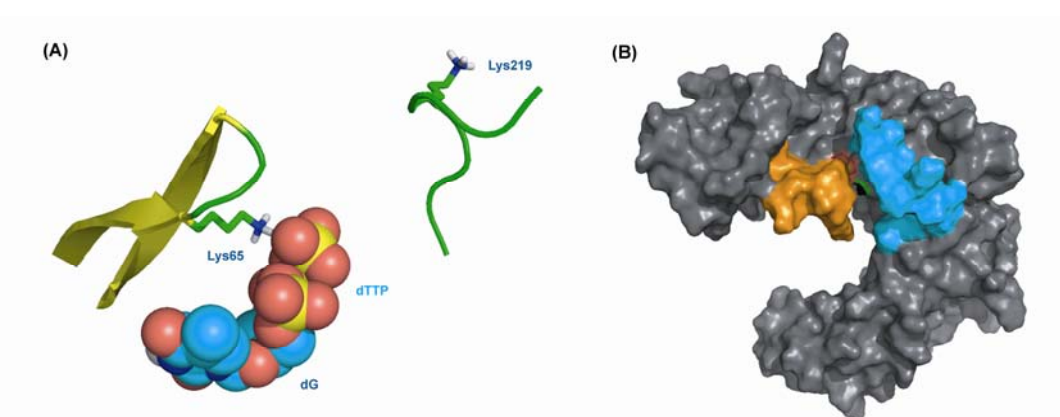
Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran que la delección Δ67, junto con las mutaciones T69G y K70R, genera niveles de actividad fosforolítica dependiente de ATP sensiblemente más altos que los presentados por la enzima WT (NL4-3), cuando se emplean como sustratos iniciadores bloqueados con AZTMP y en menor medida con d4TMP. Por otro lado, la enzima portadora de la delección Δ67 y las mutaciones M41L, T69G, K70R y T215Y (Δ67GR\_M41L/T215Y) presentaba mayores niveles de actividad fosforolítica dependiente de ATP que la RT M41L/T215Y, cuando las RTs se ensayaban utilizando iniciadores bloqueados con AZT o d4T. Los resultados de nuestros estudios enzimáticos son consistentes con los obtenidos en ensayos fenotípicos con los clones del VIH-1 recombinantes portadores de las correspondientes RTs (**Tablas 15 y 16**).

Además, se ha descrito que la mutación K70R (que acompaña a Δ67 en nuestras RTs) puede producir por sí sola un incremento moderado en la resistencia al AZT (Kellam *et al.*, 1994). Aunque no se ha observado un incremento en la resistencia fenotípica para el AZT con la RT portadora de los cambios Δ67/T69G (Imamichi *et al.*, 2000b; Imamichi *et al.*, 2001), se ha visto que la introducción de ambas mutaciones en una RT que contenía varias TAMs como K70R, T215F y K219Q incrementaba considerablemente la resistencia al AZT (Imamichi *et al.*, 2000b, 2001).

El anillo plano del azúcar presente en el d4T (que tiene un doble enlace entre los átomos C2' y C3' del anillo de ribosa, **Figura 6**) hace de éste un peor sustrato en comparación con el AZT para la reacción de escisión, lo que explicaría los niveles más bajos de actividad fosforolítica observados con iniciadores bloqueados con d4TMP (**Figura 45**). Sin embargo, el incremento de la escisión observado con las RTs M41L/T215Y y Δ67GR\_LY, utilizando iniciadores bloqueados con d4T, no se ve reflejado

en ensayos fenotípicos (Tabla 15). Estudios anteriores han demostrado que la reacción de fosforólisis en presencia de iniciadores bloqueados con d4T es inhibida por concentraciones micromolares del siguiente dNTP complementario ( $CI_{50} = 0,5-10 \mu M$ ), mientras que la escisión de AZT es 50 veces menos sensible a esta inhibición ( $CI_{50} > 150 \mu M$ ) (Meyer *et al.*, 2000). En líneas celulares utilizadas en estudios con el VIH-1, se ha estimado que los niveles de dNTP varían de 10 a 300  $\mu M$  (revisado en: Traut, 1994; Smith y Scott., 2006). Así, los niveles elevados de dNTP en las células MT-4 utilizadas en los ensayos fenotípicos podrían explicar las diferencias de susceptibilidad observadas en estos ensayos entre el AZT y el d4T, con las enzimas portadoras de TAMs.

Al contrario de lo observado con la RT  $\Delta 69$ , el modelo molecular obtenido para la RT  $\Delta 67$  unida a un complejo molde-iniciador y a un dNTP entrante sugiere que la Lys65 mantiene su interacción con el fosfato y del dNTP, mientras que la cadena lateral de la Lys219 se aleja del sitio de unión del nucleótido (Figura 49). Por tanto, el puente salino entre las cadenas laterales de Asp67 y Lys219 se pierde en el modelo de la RT  $\Delta 67$ . De esta forma, podría facilitarse la entrada del donador de PPi, tal como se ha propuesto en estudios anteriores (Boyer *et al.*, 2001), y cuya hipótesis puede verse sustentada por nuestros resultados, en los que se observa un incremento en la actividad fosforolítica dependiente de ATP cuando la delección  $\Delta 67$  está presente. Reordenamientos en la horquilla  $\beta 3-\beta 4$  y cambios en la conformación de las cadenas  $\beta 11a$  (residuos 214-217) y  $\beta 12$  (residuos 227-229) permitirían una mayor accesibilidad del sitio de unión del dNTP (sitio N) a la entrada del donador de PPi (Figura 50B) y probablemente estos cambios estructurales faciliten además la interacción del ATP con las TAMs (Tu *et al.*, 2010).



**Figura 50. Modelo estructural de la RT mutante  $\Delta 67$ .** (A) Representación de la cadena polipeptídica en forma de lazo de los residuos 63-73 y 214-228 en el modelo estructural de la RT  $\Delta 67$ . Las cadenas laterales de Lys65 y Lys219 se representan en verde. El nucleótido entrante (dTTP) y el nucleótido en el extremo 3' del iniciador se representan con un modelo de esferas. (B) Vista de la superficie del modelo molecular de la RT  $\Delta 67$  mostrando la ubicación de los residuos 63-73 (naranja) de la horquilla  $\beta 3-\beta 4$  y los residuos 214-228 (verde). El dNTP entrante (parcialmente cubierto por las estructuras coloreadas) se representa con un modelo de esferas. Se utiliza la numeración de secuencia de la RT WT. Figura obtenida a partir de las coordenadas del modelo molecular de la RT  $\Delta 67$ .



Trabajos recientes, basados en el análisis de secuencias del VIH-1 obtenidas de pacientes tratados con NRTIs, apoyan la existencia de dos patrones mutacionales distintos que confieren resistencia a AZT. El primer patrón (designado como TAM1) implica la asociación de M41L, L210W y T215Y. El segundo (TAM2) incluye las mutaciones D67N, K70R y K219E/Q y a veces T215F (Yahi *et al.*, 1999; Hanna *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2006; Svicher *et al.*, 2006). Los análisis de secuencias realizados a lo largo de nuestro trabajo revelaron una sólida relación entre la delección  $\Delta 67$  y el grupo de las TAM2 (D67N, K70R y K219E/Q), así como con la TAM1 M41L (**Figura 41**). La mutación K219E es la TAM2 que se asocia con mayor frecuencia con la delección  $\Delta 67$  (**Figura 40**). Sin embargo, al introducir el cambio K219E en la RT portadora de  $\Delta 67$  no observamos diferencias significativas en su actividad fosforolítica, ni tampoco cambios significativos en la sensibilidad del virus al AZT o al d4T (**Tabla 15**). Según el modelo molecular obtenido para la RT  $\Delta 67$ , la delección eliminaría por completo cualquier posible interacción con Lys219, de tal manera que el acceso del donador de PPi al sitio de unión no se vería afectado por el cambio de Lys por Glu en la posición 219.

En trabajos anteriores se ha demostrado que la delección  $\Delta 67$  incrementa la capacidad replicativa de virus portadores de RTs que llevan en su secuencia TAMs, que como consecuencia de la generación de resistencia al AZT pierden capacidad replicativa con respecto al virus WT (Imamichi *et al.*, 2000a). Pensamos que la delección  $\Delta 67$  también podría estar confiriendo una ventaja replicativa a los virus portadores de los complejos de mutaciones M41L/T69G/K70R/T215Y y T69G/K70R/K219E en la RT. Sin embargo, serían necesarios estudios de capacidad replicativa con virus recombinantes que lleven las RTs mutantes para comprobar esta hipótesis.

En resumen, los datos presentados en esta Tesis Doctoral demuestran la importancia de las delecciones que forman la horquilla  $\beta 3$ - $\beta 4$  del subdominio “fingers” de la RT del VIH-1, ya que se ha demostrado su implicación en resistencia a NRTIs a través de mecanismos de discriminación de nucleótido y fosforólisis dependiente de ATP y PPi. Además, proponemos que los patrones de mutaciones que se asocian con estas delecciones podrían explicarse en base a su papel en el mecanismo de fosforólisis dependiente de ATP o PPi, y a su capacidad para escindir análogos de nucleótido de la cadena de DNA que se está sintetizando.



## **6.CONCLUSIONES**



1. La delección  $\Delta 69$  no afecta de forma significativa a la sensibilidad de la RT por AZT y efavirenz cuando la enzima contiene múltiples mutaciones asociadas a resistencia a NRTIs y NNRTIs. Sin embargo, en este contexto de secuencia, el cambio S163I aumenta ligeramente la resistencia de la RT mutante MDR\_ $\Delta 69$  al efavirenz, lo que coincide con los resultados obtenidos en ensayos de eficacia biológica ("fitness"), en los que se vio que el virus portador de la RT MDR\_ $\Delta 69$ /S163I tenía mayor capacidad replicativa en presencia de efavirenz.
2. Aunque los cambios del complejo de la Q151M (A62V, V75I, F77L, F116Y y Q151M) y K103N presentes en las RTs multirresistentes justificarían por sí solos niveles altos de resistencia a AZT y efavirenz, respectivamente, existen otros cambios de aminoácido en las RTs multirresistentes que contribuirían a elevar aún más la resistencia a dichos fármacos.
3. La mutación A376S, localizada en el subdominio "connection" de la RT del VIH-1, produce una disminución de sensibilidad a nevirapina, debida a una pérdida de afinidad por el inhibidor, que podría relacionarse con la menor constante de disociación ( $K_d$ ) de la RT mutante y el complejo molde-iniciador (DNA/DNA).
4. La delección  $\Delta 69$  confiere bajos niveles de resistencia a 3TC en ensayos fenotípicos, a través de una reducción en la capacidad de la RT para incorporar el inhibidor (3TCTP) en comparación con el sustrato natural (dCTP), sin afectar a la actividad fosforolítica dependiente de ATP de la enzima.
5. La hipersensibilidad al AZT, conferida por  $\Delta 69$  en un contexto de secuencia WT (NL4-3), no se puede atribuir a un efecto de la delección sobre la capacidad de la RT para discriminar entre AZTTP y dTTP, sino a una disminución de su capacidad de escisión de análogos a timidina en presencia de ATP o PPi. La delección  $\Delta 69$  (y sus mutaciones acompañantes S68G y K70G) tuvo un efecto antagónico significativo sobre la escisión, cuando dichos cambios se introdujeron en presencia de las TAMs M41L y T215Y.
6. La delección  $\Delta 69$ , en un contexto de secuencia WT (NL4-3), no tiene influencia sobre la resistencia a foscarnet en reacciones de polimerización llevadas a cabo con la enzima recombinante. En ensayos de pirofosforólisis mediados por foscarnet, las tasas de escisión ( $k_{es}$ ) mostradas por la RT WT y las mutantes  $\Delta 69$  y T69A fueron similares. Sin embargo, dichas tasas fueron aproximadamente 1000 veces inferiores a las obtenidas en presencia de PPi con las tres enzimas.

7. La delección  $\Delta 67$ , acompañada de las mutaciones T69G y K70R, produce un aumento significativo de los niveles de escisión de análogos a timidina en presencia de ATP, tanto en el contexto de secuencia de una RT WT, como en presencia de las TAMs M41L y T215Y.

8. La sustitución de Lys219 por Glu (K219E) no afecta de forma significativa a la actividad fosforolítica dependiente de ATP o PPi de RTs mutantes portadoras de la delección  $\Delta 67$ . Sin embargo, K219E disminuye la capacidad de la RT portadora de  $\Delta 69$  para escindir análogos a timidina en presencia de PPi. Los efectos de K219E sobre la actividad fosforolítica podrían explicarse por los cambios en la accesibilidad de la molécula donadora de PPi al sitio de unión de nucleótido (sitio N) de la RT, predichos por los modelos moleculares de las enzimas portadoras de  $\Delta 67$  o  $\Delta 69$ .

## **7. BIBLIOGRAFÍA**





- Adamson, C. S. y Freed, E. O. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Adv Pharmacol*, **55**, 347-387.
- Alkhatib, G. (2009) The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS*, **4**, 96-103.
- Andries, K., Azijn, H., Thielemans, T., Ludovici, D., Kukla, M., Heeres, J., Janssen, P., De Corte, B., Vingerhoets, J., Pauwels, R. y de Béthune, M. P. (2004) TMC125, a novel next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor active against nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 4680-4686.
- Antinori, A., Trotta, M. P., Lorenzini, P., Torti, C., Gianotti, N., Maggiolo, F., Ceccherini-Silberstein, F., Nasto, P., Castagna, A., De Luca, A., Mussini, C., Andreoni, M. y Perno, C. F. (2007) Virological response to salvage therapy in HIV-infected persons carrying the reverse transcriptase K65R mutation. *Antivir Ther*, **12**, 1175-1183.
- Argos, P. (1988) A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Res*, **16**, 9909-9916.
- Arion, D., Borkow, G., Gu, Z., Wainberg, M. A. y Parniak, M. A. (1996) The K65R mutation confers increased DNA polymerase processivity to HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem*, **271**, 19860-19864.
- Arion, D., Kaushik, N., McCormick, S., Borkow, G. y Parniak, M. A. (1998) Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry*, **37**, 15908-15917.
- Arion, D., Sluis-Cremer, N. y Parniak, M. A. (2000) Mechanism by which phosphonoformic acid resistance mutations restore 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) sensitivity to AZT-resistant HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem*, **275**, 9251-9255.
- Arts, E. J., Ghosh, M., Jacques, P. S., Ehresmann, B. y Le Grice, S. F. (1996) Restoration of tRNA<sup>3</sup>Lys-primed(-)-strand DNA synthesis to an HIV-1 reverse transcriptase mutant with extended tRNAs. Implications for retroviral replication. *J Biol Chem*, **271**, 9054-9061.
- Arts, E. J. y Wainberg, M. A. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and early events in reverse transcription. *Adv Virus Res*, **46**, 97-163.
- Bacheler, L., Jeffrey, S., Hanna, G., D'Aquila, R., Wallace, L., Logue, K., Cordova, B., Hertogs, K., Larder, B., Buckery, R., Baker, D., Gallagher, K., Scarnati, H., Tritch, R. y Rizzo, C. (2001) Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *J Virol*, **75**, 4999-5008.
- Baltimore, D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, **226**, 1209-1211.
- Balzarini, J. (2004) Current status of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Curr Top Med Chem*, **4**, 921-944.
- Balzarini, J. y De Clercq, E. (1996) Analysis of inhibition of retroviral reverse transcriptase. *Methods Enzymol*, **275**, 472-502.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. y Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868-871.

Barshop, B. A., Adamson, D. T., Vellom, D. C., Rosen, F., Epstein, B. L. y Seegmiller, J.E. (1991) Luminescent immobilized enzyme test systems for inorganic pyrophosphate: assays using firefly luciferase and nicotinamide-mono-nucleotide adenyl transferase or adenosine-5'-triphosphate sulfurylase. *Anal Biochem*, **197**, 266-272.

Basavapathruni, A. y Anderson, K. S. (2007) Reverse transcription of the HIV-1 pandemic. *FASEB J*, **21**, 3795-3808.

Baxter, J. D., Schapiro, J. M., Boucher, C. A., Kohlbrenner, V. M., Hall, D. B., Scherer, J. R. y Mayers, D. L. (2006) Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 protease associated with reduced susceptibility and virologic response to the protease inhibitor tipranavir. *J Virol*, **80**, 10794-10801.

Bazmi, H. Z., Hammond, J. L., Cavalcanti, S. C., Chu, C. K., Schinazi, R. F. y Mellors, J. W. (2000) In vitro selection of mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that decrease susceptibility to (-)-β-D-dioxolane-guanosine and suppress resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 1783-1788.

Bazzoli, C., Jullien, V., Le Tiec, C., Rey, E., Mentré, F. y Taburet, A. M. (2010) Intracellular Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs in HIV-Infected Patients, and their Correlation with Drug Action. *Clin Pharmacokinet*, **49**, 17-45.

Beerenwinkel, N., Schmidt, B., Walter, H., Kaiser, R., Lengauer, T., Hoffmann, D., Korn, K. y Selbig, J. (2002) Diversity and complexity of HIV-1 drug resistance: a bioinformatics approach to predicting phenotype from genotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8271-8276.

Betancor, G., Puertas, M. C., Nevot, M., Garriga, C., Martínez, M. A., Martínez-Picado, J. y Menéndez-Arias, L. (2010) Mechanisms involved in the selection of HIV-1 reverse transcriptase thumb subdomain polymorphisms associated with nucleoside analogue therapy failure. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**, 4799-4811.

Bieniasz, P. D. (2009) The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe*, **5**, 550-558.

Biondi, M. J., Beilhartz, G. L., McCormick, S. y Götte, M. (2010) N348I in HIV-1 reverse transcriptase can counteract the nevirapine-mediated bias toward RNase H cleavage during plus-strand initiation. *J Biol Chem*, **285**, 26966-26975.

Boretto, J., Longhi, S., Navarro, J. M., Selmi, B., Sire, J. y Canard, B. (2001) An integrated system to study multiply substituted human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Anal Biochem*, **292**, 139-147.

Boyer, J. C., Bebenek, K. y Kunkel, T. A. (1992) Unequal human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase error rates with RNA and DNA templates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6919-6923.

- Boyer, P. L., Imamichi, T., Sarafianos, S. G., Arnold, E. y Hughes, S. H. (2004) Effects of the  $\Delta 67$  complex of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on nucleoside analog excision. *J Virol*, **78**, 9987-9997.
- Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E. y Hughes, S. H. (2001) Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol*, **75**, 4832-4842.
- Briones, C., Mas, A., Pérez-Olmeda, M., Altisent, C., Domingo, E. y Soriano, V. (2001) Prevalence and genetic heterogeneity of the reverse transcriptase T69S-S-X insertion in pretreated HIV-infected patients. *Intervirology*, **44**, 339-343.
- Bruenn, J. A. (2003) A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1821-1829.
- Cahn, P. y Wainberg, M. A. (2010) Resistance profile of the new nucleoside reverse transcriptase inhibitor apricitabine. *J Antimicrob Chemother*, **65**, 213-217.
- Carpenter, C. C., Cooper, D. A., Fischl, M. A., Gatell, J. M., Gazzard, B. G., Hammer, S. M., Hirsch, M. S., Jacobsen, D. M., Katzenstein, D. A., Montaner, J. S., Richman, D. D., Saag, M. S., Schechter, M., Schooley, R. T., Thompson, M. A., Vella, S., Yeni, P. G. y Volberding, P. A. (2000) Antiretroviral therapy in adults: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA*, **283**, 381-390.
- Carroll, S. S., Geib, J., Olsen, D. B., Stahlhut, M., Shafer, J. A. y Kuo, L. C. (1994) Sensitivity of HIV-1 reverse transcriptase and its mutants to inhibition by azidothymidine triphosphate. *Biochemistry*, **33**, 2113-2120.
- Castro, H. C., Loureiro, N. I., Pujol-Luz, M., Souza, A. M., Albuquerque, M. G., Santos, D. O., Cabral, L. M., Frugulhetti, I. C. y Rodrigues, C. R. (2006) HIV-1 reverse transcriptase: a therapeutic target in the spotlight. *Curr Med Chem*, **13**, 313-324.
- Ceccherini-Silberstein, F., Svicher, V., Sing, T., Artese, A., Santoro, M. M., Forbici, F., Bertoli, A., Alcaro, S., Palamara, G., d'Arminio Monforte, A., Balzarini, J., Antinori, A., Lengauer, T. y Perno, C. F. (2007) Characterization and structural analysis of novel mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase involved in the regulation of resistance to nonnucleoside inhibitors. *J Virol*, **81**, 11507-11519.
- Cimarelli, A. y Darlix, J. L. (2002) Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 1166-1184.
- Coakley, E. P., Gillis, J. M. y Hammer, S. M. (2000) Phenotypic and genotypic resistance patterns of HIV-1 isolates derived from individuals treated with didanosine and stavudine. *AIDS*, **14**, F9-15.
- Cozzi-Lepri, A., Ruiz, L., Loveday, C., Phillips, A. N., Clotet, B., Reiss, P., Ledergerber, B., Holkmann, C., Staszewski, S. y Lundgren, J. D. (2005) Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy. *Antivir Ther*, **10**, 791-802.
- Cruchaga, C., Anso, E., Rouzaut, A. y Martínez-Irujo, J. J. (2006) Selective excision of chain-terminating nucleotides by HIV-1 reverse transcriptase with phosphonoformate as substrate. *J Biol Chem*, **281**, 27744-27752.

Cheung, P. K., Wynhoven, B. y Harrigan, P. R. (2004) 2004: which HIV-1 drug resistance mutations are common in clinical practice? *AIDS Rev*, **6**, 107-116.

Dahl, V., Josefsson, L. y Palmer, S. (2010) HIV reservoirs, latency, and reactivation: prospects for eradication. *Antiviral Res*, **85**, 286-294.

Dalglish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. y Weiss, R. A. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, **312**, 763-767.

Das, K., Bauman, J. D., Clark, A. D., Jr., Frenkel, Y. V., Lewi, P. J., Shatkin, A. J., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2008) High-resolution structures of HIV-1 reverse transcriptase/TMC278 complexes: strategic flexibility explains potency against resistance mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 1466-1471.

Das, K., Ding, J., Hsiou, Y., Clark, A. D., Jr., Moereels, H., Koymans, L., Andries, K., Pauwels, R., Janssen, P. A., Boyer, P. L., Clark, P., Smith, R. H., Jr., Kroeger Smith, M. B., Michejda, C. J., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1996) Crystal structures of 8-Cl and 9-Cl TIBO complexed with wild-type HIV-1 RT and 8-Cl TIBO complexed with the Tyr181Cys HIV-1 RT drug-resistant mutant. *J Mol Biol*, **264**, 1085-1100.

Das, K., Lewi, P. J., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2005) Crystallography and the design of anti-AIDS drugs: conformational flexibility and positional adaptability are important in the design of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Prog Biophys Mol Biol*, **88**, 209-231.

Das, K., Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Boyer, P. L., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2007) Crystal structures of clinically relevant Lys103Asn/Tyr181Cys double mutant HIV-1 reverse transcriptase in complexes with ATP and non-nucleoside inhibitor HBY 097. *J Mol Biol*, **365**, 77-89.

de Béthune, M. P. (2010) Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009). *Antiviral Res*, **85**, 75-90.

De Clercq, E. (2004) Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): past, present, and future. *Chem Biodivers*, **1**, 44-64.

De Clercq, E. y Holy, A. (2005) Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov*, **4**, 928-940.

De Corte, B. L. (2005) From 4,5,6,7-tetrahydro-5-methylimidazo[4,5,1-jk]-(1,4)-benzodiazepin-2(1H)-one (TIBO) to etravirine (TMC125): fifteen years of research on non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *J Med Chem*, **48**, 1689-1696.

De La Rosa, J., Kotb, M. y Kredich, N. M. (1991) Regulation of S-adenosylmethionine synthetase activity in cultured human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1077**, 225-232.

De Luca, A., Di Giambenedetto, S., Romano, L., Gonnelli, A., Corsi, P., Baldari, M., Di Pietro, M., Menzo, S., Francisci, D., Almi, P. y Zazzi, M. (2006) Frequency and treatment-related predictors of thymidine-analogue mutation patterns in HIV-1 isolates after unsuccessful antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, **193**, 1219-1222.

- De Luca, A., Giambenedetto, S. D., Trotta, M. P., Colafigli, M., Prosperi, M., Ruiz, L., Baxter, J., Clevenbergh, P., Cauda, R., Perno, C. F. y Antinori, A. (2007) Improved interpretation of genotypic changes in the HIV-1 reverse transcriptase coding region that determine the virological response to didanosine. *J Infect Dis*, **196**, 1645-1653.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D. y Argos, P. (1990) An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng*, **3**, 461-467.
- Demeter, L. M., Nawaz, T., Morse, G., Dolin, R., Dexter, A., Gerondelis, P. y Reichman, R. C. (1995) Development of zidovudine resistance mutations in patients receiving prolonged didanosine monotherapy. *J Infect Dis*, **172**, 1480-1485.
- Depollier, J., Hourdou, M. L., Aldrian-Herrada, G., Rothwell, P., Restle, T. y Divita, G. (2005) Insight into the mechanism of a peptide inhibitor of HIV reverse transcriptase dimerization. *Biochemistry*, **44**, 1909-1918.
- Deval, J., Alvarez, K., Selmi, B., Bermond, M., Boretto, J., Guerreiro, C., Mulard, L. y Canard, B. (2005) Mechanistic insights into the suppression of drug resistance by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase using  $\alpha$ -boranophosphate nucleoside analogs. *J Biol Chem*, **280**, 3838-3846.
- Deval, J., Courcambeck, J., Selmi, B., Boretto, J. y Canard, B. (2004a) Structural determinants and molecular mechanisms for the resistance of HIV-1 RT to nucleoside analogues. *Curr Drug Metab*, **5**, 305-316.
- Deval, J., Selmi, B., Boretto, J., Egloff, M. P., Guerreiro, C., Sarfati, S. y Canard, B. (2002) The molecular mechanism of multidrug resistance by the Q151M human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and its suppression using  $\alpha$ -boranophosphate nucleotide analogues. *J Biol Chem*, **277**, 42097-42104.
- Deval, J., White, K. L., Miller, M. D., Parkin, N. T., Courcambeck, J., Halfon, P., Selmi, B., Boretto, J. y Canard, B. (2004b) Mechanistic basis for reduced viral and enzymatic fitness of HIV-1 reverse transcriptase containing both K65R and M184V mutations. *J Biol Chem*, **279**, 509-516.
- Dharmasena, S., Pongracz, Z., Arnold, E., Sarafianos, S. G. y Parniak, M. A. (2007) 3'-Azido-3'-deoxythymidine-(5')-tetraphospho-(5')-adenosine, the product of ATP-mediated excision of chain-terminating AZTMP, is a potent chain-terminating substrate for HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, **46**, 828-836.
- di Marzo Veronese, F., Copeland, T. D., DeVico, A. L., Rahman, R., Oroszlan, S., Gallo, R. C. y Sarngadharan, M. G. (1986) Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science*, **231**, 1289-1291.
- Ding, J., Das, K., Moereels, H., Koymans, L., Andries, K., Janssen, P. A., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1995a) Structure of HIV-1 RT/TIBO R 86183 complex reveals similarity in the binding of diverse nonnucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol*, **2**, 407-415.
- Ding, J., Das, K., Tantillo, C., Zhang, W., Clark, A. D., Jr., Jessen, S., Lu, X., Hsiou, Y., Jacobo-Molina, A., Andries, K., Pauwels, R., Moereels, H., Koymans, L., Janssen, P., Smith, R., Kroeger, M., Michejda, C., Hughes, S. y Arnold, E. (1995b) Structure of HIV-1 reverse transcriptase in a complex with the non-nucleoside inhibitor  $\alpha$ -APA R 95845 at 2.8 Å resolution. *Structure*, **3**, 365-379.

Ding, J., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1997) Protein-nucleic acid interactions and DNA conformation in a complex of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with a double-stranded DNA template-primer. *Biopolymers*, **44**, 125-138.

Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. y Paxton, W. A. (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, **381**, 667-673.

Eggink, D., Huigen, M. C., Boucher, C. A., Götte, M. y Nijhuis, M. (2007) Insertions in the  $\beta$ 3- $\beta$ 4 loop of reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 and their mechanism of action, influence on drug susceptibility and viral replication capacity. *Antiviral Res*, **75**, 93-103.

Esnouf, R., Ren, J., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D. y Stuart, D. (1995) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol*, **2**, 303-308.

Esnouf, R. M., Ren, J., Hopkins, A. L., Ross, C. K., Jones, E. Y., Stammers, D. K. y Stuart, D. I. (1997) Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3984-3989.

Feng, J. Y. y Anderson, K. S. (1999) Mechanistic studies examining the efficiency and fidelity of DNA synthesis by the 3TC-resistant mutant (184V) of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, **38**, 9440-9448.

Feng, J. Y., Myrick, F. T., Margot, N. A., Mulamba, G. B., Rimsky, L., Borroto-Esoda, K., Selmi, B. y Canard, B. (2006) Virologic and enzymatic studies revealing the mechanism of K65R- and Q151M-associated HIV-1 drug resistance towards emtricitabine and lamivudine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **25**, 89-107.

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. y Berger, E. A. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, **272**, 872-877.

Figueiredo, A., Zelina, S., Sluis-Cremer, N. y Tachedjian, G. (2008) Impact of residues in the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding pocket on HIV-1 reverse transcriptase heterodimer stability. *Curr HIV Res*, **6**, 130-137.

Fisher, T. S., Darden, T. y Prasad, V. R. (2003) Substitutions at Phe61 in the  $\beta$ 3- $\beta$ 4 hairpin of HIV-1 reverse transcriptase reveal a role for the Fingers subdomain in strand displacement DNA synthesis. *J Mol Biol*, **325**, 443-459.

Flandre, P., Descamps, D., Joly, V., Meiffrédy, V., Tamalet, C., Izopet, J. y Brun-Vézinet, F. (2004) A survival method to estimate the time to occurrence of mutations: an application to thymidine analogue mutations in HIV-1-infected patients. *J Infect Dis*, **189**, 862-870.

Fletcher, P., Harman, S., Azijn, H., Armanasco, N., Manlow, P., Perumal, D., de Béthune, M. P., Nuttall, J., Romano, J. y Shattock, R. (2009) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by the candidate microbicide dapivirine, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**, 487-495.

Flint, S. J., Enquist, W., Krug, W. M., Racaniello, V. R. y Skalka, A. M. (2001) *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. Washington, D.C, EE.UU.

- Fouchier, R. A., Meyer, B. E., Simon, J. H., Fischer, U. y Malim, M. H. (1997) HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *EMBO J*, **16**, 4531-4539.
- Frangoul, A., Bussetta, C., Deval, J., Barral, K., Alvarez, K. y Canard, B. (2008) Gln151 of HIV-1 reverse transcriptase acts as a steric gate towards clinically relevant acyclic phosphonate nucleotide analogues. *Antivir Ther*, **13**, 115-124.
- Frankel, F. A., Marchand, B., Turner, D., Götte, M. y Wainberg, M. A. (2005) Impaired rescue of chain-terminated DNA synthesis associated with the L74V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 2657-2664.
- Freed, E. O. y Martin, M. A. (1995) The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem*, **270**, 23883-23886.
- Freed, E. O. y Mouland, A. J. (2006) The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology*, **3**, 77.
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J. y Safai, B. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, **224**, 500-503.
- García-Pérez, J., Pérez-Olmeda, M., Sánchez-Palomino, S., Menéndez-Arias, L., Valer, L., García, F., Pumarola, T., Soriano, V. y Alcami, J. (2006) Strong decrease in viral replication capacity in HIV-1 containing both K65R and Q151M mutations. *Antiviral Therapy*, **11**, S44.
- Garforth, S. J., Domaoal, R. A., Lwatula, C., Landau, M. J., Meyer, A. J., Anderson, K. S. y Prasad, V. R. (2010) K65R and K65A substitutions in HIV-1 reverse transcriptase enhance polymerase fidelity by decreasing both dNTP misinsertion and mispaired primer extension efficiencies. *J Mol Biol*, **401**, 33-44.
- Garforth, S. J., Kim, T. W., Parniak, M. A., Kool, E. T. y Prasad, V. R. (2007) Site-directed mutagenesis in the fingers subdomain of HIV-1 reverse transcriptase reveals a specific role for the  $\beta 3$ - $\beta 4$  hairpin loop in dNTP selection. *J Mol Biol*, **365**, 38-49.
- Geitmann, M., Unge, T. y Danielson, U. H. (2006) Interaction kinetic characterization of HIV-1 reverse transcriptase non-nucleoside inhibitor resistance. *J Med Chem*, **49**, 2375-2387.
- Gewurz, B. E., Jacobs, M., Proper, J. A., Dahl, T. A., Fujiwara, T. y Dezube, B. J. (2004) Capravirine, a nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor in patients infected with HIV-1: a phase 1 study. *J Infect Dis*, **190**, 1957-1961.
- Goldschmidt, V., Didierjean, J., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Isel, C. y Marquet, R. (2006)  $Mg^{2+}$  dependency of HIV-1 reverse transcription, inhibition by nucleoside analogues and resistance. *Nucleic Acids Res*, **34**, 42-52.
- Goldschmidt, V. y Marquet, R. (2004) Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs). *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 1687-1705.

Gómez-Carrillo, M., Quarleri, J. F., Rubio, A. E., Carobene, M. G., Dileirnia, D., Carr, J. K. y Salomon, H. (2004) Drug resistance testing provides evidence of the globalization of HIV type 1: a new circulating recombinant form. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **20**, 885-888.

Gonzales, M. J., Wu, T. D., Taylor, J., Belitskaya, I., Kantor, R., Israelski, D., Chou, S., Zolopa, A. R., Fessel, W. J. y Shafer, R. W. (2003) Extended spectrum of HIV-1 reverse transcriptase mutations in patients receiving multiple nucleoside analog inhibitors. *AIDS*, **17**, 791-799.

Goodman, M. F., Creighton, S., Bloom, L. B. y Petruska, J. (1993) Biochemical basis of DNA replication fidelity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **28**, 83-126.

Götte, M., Arion, D., Parniak, M. A. y Wainberg, M. A. (2000) The M184V mutation in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 impairs rescue of chain-terminated DNA synthesis. *J Virol*, **74**, 3579-3585.

Götte, M. (2007) Should we include connection domain mutations of HIV-1 reverse transcriptase in HIV resistance testing. *PLoS Med*, **4**, e346.

Gribble, F. M., Loussouarn, G., Tucker, S. J., Zhao, C., Nichols, C. G. y Ashcroft, F. M. (2000) A novel method for measurement of submembrane ATP concentration. *J Biol Chem*, **275**, 30046-30049.

Gu, Z., Allard, B., de Muys, J. M., Lippens, J., Rando, R. F., Nguyen-Ba, N., Ren, C., McKenna, P., Taylor, D. L. y Bethell, R. C. (2006) In vitro antiretroviral activity and in vitro toxicity profile of SPD754, a new deoxycytidine nucleoside reverse transcriptase inhibitor for treatment of human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 625-631.

Gupta, S., Fransen, S., Paxinos, E. E., Stawiski, E., Huang, W. y Petropoulos, C. J. (2010) Combinations of mutations in the connection domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: assessing the impact on nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**, 1973-1980.

Hachiya, A., Shimane, K., Sarafianos, S. G., Kodama, E. N., Sakagami, Y., Negishi, F., Koizumi, H., Gatanaga, H., Matsuoka, M., Takiguchi, M. y Oka, S. (2009) Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of antiretroviral treatment-naïve patients. *Antiviral Res*, **82**, 115-121.

Hammond, E., McKinnon, E. y Nolan, D. (2010) Human immunodeficiency virus treatment-induced adipose tissue pathology and lipoatrophy: prevalence and metabolic consequences. *Clin Infect Dis*, **51**, 591-599.

Hammond, J. L., Koontz, D. L., Bazmi, H. Z., Beadle, J. R., Hostetler, S. E., Kini, G. D., Aldern, K. A., Richman, D. D., Hostetler, K. Y. y Mellors, J. W. (2001) Alkylglycerol prodrugs of phosphonoformate are potent in vitro inhibitors of nucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 and select for resistance mutations that suppress zidovudine resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 1621-1628.

Hanna, G. J., Johnson, V. A., Kuritzkes, D. R., Richman, D. D., Brown, A. J., Savara, A. V., Hazelwood, J. D. y D'Aquila, R. T. (2000) Patterns of resistance mutations selected by treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection with zidovudine, didanosine, and nevirapine. *J Infect Dis*, **181**, 904-911.



Harris, D., Lee, R., Misra, H. S., Pandey, P. K. y Pandey, V. N. (1998) The p51 subunit of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase is essential in loading the p66 subunit on the template primer. *Biochemistry*, **37**, 5903-5908.

Himmel, D. M., Das, K., Clark, A. D., Jr., Hughes, S. H., Benjahad, A., Oumouch, S., Guillemont, J., Coupa, S., Poncelet, A., Csoka, I., Meyer, C., Andries, K., Nguyen, C. H., Grierson, D. S. y Arnold, E. (2005) Crystal structures for HIV-1 reverse transcriptase in complexes with three pyridinone derivatives: a new class of non-nucleoside inhibitors effective against a broad range of drug-resistant strains. *J Med Chem*, **48**, 7582-7591.

Hopkins, A. L., Ren, J., Esnouf, R. M., Willcox, B. E., Jones, E. Y., Ross, C., Miyasaka, T., Walker, R. T., Tanaka, H., Stammers, D. K. y Stuart, D. I. (1996) Complexes of HIV-1 reverse transcriptase with inhibitors of the HEPT series reveal conformational changes relevant to the design of potent non-nucleoside inhibitors. *J Med Chem*, **39**, 1589-1600.

Hostomsky, Z., Hostomska, Z., Fu, T. B. y Taylor, J. (1992) Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1: functionality of subunits of the heterodimer in DNA synthesis. *J Virol*, **66**, 3179-3182.

Hottiger, M. y Hübscher, U. (1996) Human Immunodeficiency Virus type 1 reverse transcriptase. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **377**, 97-120.

Hsiou, Y., Das, K., Ding, J., Clark, A. D., Jr., Kleim, J. P., Rosner, M., Winkler, I., Riess, G., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1998) Structures of Tyr188Leu mutant and wild-type HIV-1 reverse transcriptase complexed with the non-nucleoside inhibitor HBY 097: inhibitor flexibility is a useful design feature for reducing drug resistance. *J Mol Biol*, **284**, 313-323.

Hsiou, Y., Ding, J., Das, K., Clark, A. D., Jr., Boyer, P. L., Lewi, P., Janssen, P. A., Kleim, J. P., Rosner, M., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2001) The Lys103Asn mutation of HIV-1 RT: a novel mechanism of drug resistance. *J Mol Biol*, **309**, 437-445.

Hsiou, Y., Ding, J., Das, K., Clark, A. D., Jr., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1996) Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. *Structure*, **4**, 853-860.

Hu, Z., Giguere, F., Hatano, H., Reid, P., Lu, J. y Kuritzkes, D. R. (2006) Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **80**, 7020-7027

Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L. y Harrison, S. C. (1998) Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science*, **282**, 1669-1675.

Imamichi, T., Berg, S. C., Imamichi, H., Lopez, J. C., Metcalf, J. A., Falloon, J. y Lane, H. C. (2000a) Relative replication fitness of a high-level 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistant variant of human immunodeficiency virus type 1 possessing an amino acid deletion at codon 67 and a novel substitution (Thr-->Gly) at codon 69. *J Virol*, **74**, 10958-10964.

Imamichi, T., Murphy, M. A., Imamichi, H. y Lane, H. C. (2001) Amino acid deletion at codon 67 and Thr-to-Gly change at codon 69 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer novel drug resistance profiles. *J Virol*, **75**, 3988-92.

- Imamichi, T., Sinha, T., Imamichi, H., Zhang, Y. M., Metcalf, J. A., Falloon, J. y Lane, H. C. (2000b) High-level resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine due to a deletion in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **74**, 1023-1028.
- Isel, C., Ehresmann, C., Walter, P., Ehresmann, B. y Marquet, R. (2001) The emergence of different resistance mechanisms toward nucleoside inhibitors is explained by the properties of the wild type HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem*, **276**, 48725-48732.
- Iversen, A. K., Shafer, R. W., Wehrly, K., Winters, M. A., Mullins, J. I., Chesebro, B. y Merigan, T. C. (1996) Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J Virol*, **70**, 1086-1090.
- Izopet, J., Bicart-See, A., Pasquier, C., Sandres, K., Bonnet, E., Marchou, B., Puel, J. y Massip, P. (1999) Mutations conferring resistance to zidovudine diminish the antiviral effect of stavudine plus didanosine. *J Med Virol*, **59**, 507-511.
- Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J. y Varmus, H. E. (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*, **331**, 280-283.
- Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R. G., Clark, A. D., Jr., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R. L., Kamer, G., Ferris, A. L., Clark, P., Xiaode, L., Tantillo, C., Hizi, A., Hughes, S. y Arnold, E. (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6320-6324.
- Jochmans, D. (2008) Novel HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Virus Res*, **134**, 171-185.
- Johnson, V. A., Brun-Vézinet, F., Clotet, B., Gunthard, H. F., Kuritzkes, D. R., Pillay, D., Schapiro, J. M. y Richman, D. D. (2009) Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2009. *Top HIV Med*, **17**, 138-145.
- Joyce, C. M. y Steitz, T. A. (1995) Polymerase structures and function: variations on a theme? *J Bacteriol*, **177**, 6321-6329.
- Kagan, R. M., Lee, T. S., Ross, L., Lloyd, R. M., Jr., Lewinski, M. A. y Potts, S. J. (2007) Molecular basis of antagonism between K70E and K65R tenofovir-associated mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *Antiviral Res*, **75**, 210-218.
- Kakuda, T. N. (2000) Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clin Ther*, **22**, 685-708.
- Kati, W. M., Johnson, K. A., Jerva, L. F. y Anderson, K. S. (1992) Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. *J Biol Chem*, **267**, 25988-25997.
- Kaushik, N., Rege, N., Yadav, P. N., Sarafianos, S. G., Modak, M. J. y Pandey, V. N. (1996) Biochemical analysis of catalytically crucial aspartate mutants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, **35**, 11536-11546.
- Kaushik, N., Talele, T. T., Pandey, P. K., Harris, D., Yadav, P. N. y Pandey, V. N. (2000) Role of glutamine 151 of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase in substrate selection as assessed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **39**, 2912-2920.

- Kavlick, M. F., Wyvill, K., Yarchoan, R. y Mitsuya, H. (1998) Emergence of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants, viral sequence variation, and disease progression in patients receiving antiretroviral chemotherapy. *J Infect Dis*, **177**, 1506-1513.
- Kellam, P., Boucher, C. A., Tijnagel, J. M. y Larder, B. A. (1994) Zidovudine treatment results in the selection of human immunodeficiency virus type 1 variants whose genotypes confer increasing levels of drug resistance. *J Gen Virol*, **75**, 341-351.
- Kellinger, M. W. y Johnson, K. A. (2010) Nucleotide-dependent conformational change governs specificity and analog discrimination by HIV reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 7734-7739.
- Kertesz, D. J., Brotherton-Pleiss, C., Yang, M., Wang, Z., Lin, X., Qiu, Z., Hirschfeld, D. R., Gleason, S., Mirzadegan, T., Dunten, P. W., Harris, S. F., Villaseñor, A. G., Hang, J. Q., Heilek, G. M. y Klumpp, K. (2010) Discovery of piperidin-4-yl-aminopyrimidines as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. N-benzyl derivatives with broad potency against resistant mutant viruses. *Bioorg Med Chem Lett*, **20**, 4215-4218.
- Kew, Y., Olsen, L. R., Japour, A. J. y Prasad, V. R. (1998) Insertions into the  $\beta 3$ - $\beta 4$  hairpin loop of HIV-1 reverse transcriptase reveal a role for fingers subdomain in processive polymerization. *J Biol Chem*, **273**, 7529-7537.
- Kilareski, E. M., Shah, S., Nonnemacher, M. R. y Wigdahl, B. (2009) Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology*, **6**, 118.
- Kim, B., Ayran, J. C., Sagar, S. G., Adman, E. T., Fuller, S. M., Tran, N. H. y Horrigan, J. (1999) New human immunodeficiency virus, type 1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) mutants with increased fidelity of DNA synthesis. Accuracy, template binding, and processivity. *J Biol Chem*, **274**, 27666-27673.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C. y Montagnier, L. (1984) T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, **312**, 767-768.
- Kohler, J. J. y Lewis, W. (2007) A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environ Mol Mutagen*, **48**, 166-172.
- Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. y Steitz, T. A. (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, **256**, 1783-1790.
- Kräusslich, H. G. y Welker, R. (1996) Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr Top Microbiol Immunol*, **214**, 25-63.
- Krebs, R., Immendorfer, U., Thrall, S. H., Wöhr, B. M. y Goody, R. S. (1997) Single-step kinetics of HIV-1 reverse transcriptase mutants responsible for virus resistance to nucleoside inhibitors zidovudine and 3-TC. *Biochemistry*, **36**, 10292-10300.
- Lacey, S. F. y Larder, B. A. (1994) Novel mutation (V75T) in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidine in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother*, **38**, 1428-1432.

- Lacey, S. F., Reardon, J. E., Furfine, E. S., Kunkel, T. A., Bebenek, K., Eckert, K. A., Kemp, S. D. y Larder, B. A. (1992) Biochemical studies on the reverse transcriptase and RNase H activities from human immunodeficiency virus strains resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *J Biol Chem*, **267**, 15789-15794.
- Lansdon, E. B., Brendza, K. M., Hung, M., Wang, R., Mukund, S., Jin, D., Birkus, G., Kutty, N. y Liu, X. (2010) Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase with etravirine (TMC125) and rilpivirine (TMC278): implications for drug design. *J Med Chem*, **53**, 4295-4299.
- Larder, B. A., Darby, G. y Richman, D. D. (1989a) HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science*, **243**, 1731-1734.
- Larder, B. A. y Kemp, S. D. (1989) Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science*, **246**, 1155-1158.
- Larder, B. A., Kemp, S. D. y Purifoy, D. J. (1989b) Infectious potential of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutants with altered inhibitor sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 4803-4807.
- Larder, B. A., Purifoy, D. J., Powell, K. L. y Darby, G. (1987) Site-specific mutagenesis of AIDS virus reverse transcriptase. *Nature*, **327**, 716-717.
- Laughlin, M. A. y Pomerantz, R. J. (1994) Cellular latency in HIV-1 infection. *Clin Lab Med*, **14**, 239-255.
- Laurent, C., Kouanfack, C., Vergne, L., Tardy, M., Zekeng, L., Noumsi, N., Butel, C., Bourgeois, A., Mpoudi-Ngolé, E., Koulla-Shiro, S., Peeters, M. y Delaporte, E. (2006) Antiretroviral drug resistance and routine therapy, Cameroon. *Emerg Infect Dis*, **12**, 1001-1004.
- Le Grice, S. F., Naas, T., Wohlgensinger, B. y Schatz, O. (1991) Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J*, **10**, 3905-3911.
- Lennerstrand, J., Stammers, D. K. y Larder, B. A. (2001) Biochemical mechanism of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase resistance to stavudine. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 2144-2146.
- Levy, J. A., Mitra, G. y Mozen, M. M. (1984) Recovery and inactivation of infectious retroviruses from factor VIII concentration. *Lancet*, **2**, 722-723.
- Lewis, W., Day, B. J. y Copeland, W. C. (2003) Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov*, **2**, 812-822.
- Lightfoote, M. M., Coligan, J. E., Folks, T. M., Fauci, A. S., Martin, M. A. y Venkatesan, S. (1986) Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *J Virol*, **60**, 771-775.
- Lin, P. F., Samanta, H., Rose, R. E., Patick, A. K., Trimble, J., Bechtold, C. M., Revie, D. R., Khan, N. C., Federici, M. E., Li, H., Lee, A., Anderson, R. y Colonna, R. (1994) Genotypic and phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients on prolonged stavudine therapy. *J Infect Dis*, **170**, 1157-1164.

Lindberg, J., Sigurðsson, S., Löwgren, S., Andersson, H. O., Sahlberg, C., Noréen, R., Fridborg, K., Zhang, H. y Unge, T. (2002) Structural basis for the inhibitory efficacy of efavirenz (DMP-266), MSC194 and PNU142721 towards the HIV-1 RT K103N mutant. *Eur J Biochem*, **269**, 1670-1677

Lisco, A., Vanpouille, C., Tchesnokov, E. P., Grivel, J. C., Biancotto, A., Brichacek, B., Elliott, J., Fromentin, E., Shattock, R., Anton, P., Gorelick, R., Balzarini, J., McGuigan, C., Derudas, M., Götte, M., Schinazi, R. F. y Margolis, L. (2008) Acyclovir is activated into a HIV-1 reverse transcriptase inhibitor in herpesvirus-infected human tissues. *Cell Host Microbe*, **4**, 260-270.

Louis, J. M., Ishima, R., Torchia, D. A. y Weber, I. T. (2007) HIV-1 protease: structure, dynamics, and inhibition. *Adv Pharmacol*, **55**, 261-298.

Lowe, D. M., Parmar, V., Kemp, S. D. y Larder, B. A. (1991) Mutational analysis of two conserved sequence motifs in HIV-1 reverse transcriptase. *FEBS Lett*, **282**, 231-234.

Ludovici, D. W., De Corte, B. L., Kukla, M. J., Ye, H., Ho, C. Y., Lichtenstein, M. A., Kavash, R. W., Andries, K., de Béthune, M. P., Azijn, H., Pauwels, R., Lewi, P. J., Heeres, J., Koymans, L. M., de Jonge, M. R., Van Aken, K. J., Daeyaert, F. F., Das, K., Arnold, E. y Janssen, P. A. (2001a) Evolution of anti-HIV drug candidates. Part 3: Diarylpyrimidine (DAPY) analogues. *Bioorg Med Chem Lett*, **11**, 2235-2239.

Ludovici, D. W., Kavash, R. W., Kukla, M. J., Ho, C. Y., Ye, H., De Corte, B. L., Andries, K., de Béthune, M. P., Azijn, H., Pauwels, R., Moereels, H. E., Heeres, J., Koymans, L. M., de Jonge, M. R., Van Aken, K. J., Daeyaert, F. F., Lewi, P. J., Das, K., Arnold, E. y Janssen, P. A. (2001b) Evolution of anti-HIV drug candidates. Part 2: Diaryltriazine (DATA) analogues. *Bioorg Med Chem Lett*, **11**, 2229-2234.

Ludovici, D. W., Kukla, M. J., Grous, P. G., Krishnan, S., Andries, K., de Béthune, M. P., Azijn, H., Pauwels, R., De Clercq, E., Arnold, E. y Janssen, P. A. (2001c) Evolution of anti-HIV drug candidates. Part 1: From  $\alpha$ -anilinophenylacetamide ( $\alpha$ -APA) to imidoyl thiourea (ITU). *Bioorg Med Chem Lett*, **11**, 2225-2228.

Marcelin, A. G., Delaugerre, C., Wirden, M., Viegas, P., Simon, A., Katlama, C. y Calvez, V. (2004) Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure. *J Med Virol*, **72**, 162-165.

Marcelin, A. G., Flandre, P., Furco, A., Wirden, M., Molina, J. M. y Calvez, V. (2006) Impact of HIV-1 reverse transcriptase polymorphism at codons 211 and 228 on virological response to didanosine. *Antivir Ther*, **11**, 693-699.

Marchand, B. y Götte, M. (2003) Site-specific footprinting reveals differences in the translocation status of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for polymerase translocation and drug resistance. *J Biol Chem*, **278**, 35362-35372.

Marchand, B., Tchesnokov, E. P. y Götte, M. (2007) The pyrophosphate analogue foscarnet traps the pre-translocational state of HIV-1 reverse transcriptase in a Brownian ratchet model of polymerase translocation. *J Biol Chem*, **282**, 3337-3346.

Margolis, D. M. (2010) Mechanisms of HIV latency: an emerging picture of complexity. *Curr HIV/AIDS Rep*, **7**, 37-43.

- Martin, J. L., Wilson, J. E., Haynes, R. L. y Furman, P. A. (1993) Mechanism of resistance of human immunodeficiency virus type 1 to 2',3'-dideoxyinosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6135-6139.
- Martínez-Picado, J. y Martínez, M. A. (2008) HIV-1 reverse transcriptase inhibitor resistance mutations and fitness: a view from the clinic and *ex vivo*. *Virus Res*, **134**, 104-123.
- Mas, A., Parera, M., Briones, C., Soriano, V., Martínez, M. A., Domingo, E. y Menéndez-Arias, L. (2000) Role of a dipeptide insertion between codons 69 and 70 of HIV-1 reverse transcriptase in the mechanism of AZT resistance. *EMBO J*, **19**, 5752-5761.
- Mas, A., Vázquez-Álvarez, B. M., Domingo, E. y Menéndez-Arias, L. (2002) Multidrug-resistant HIV-1 reverse transcriptase: involvement of ribonucleotide-dependent phosphorolysis in cross-resistance to nucleoside analogue inhibitors. *J Mol Biol*, **323**, 181-197.
- Masquelier, B., Race, E., Tamalet, C., Descamps, D., Izopet, J., Buffet-Janvresse, C., Ruffault, A., Mohammed, A. S., Cottalorda, J., Schmuck, A., Calvez, V., Dam, E., Fleury, H. y Brun-Vézinet, F. (2001) Genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 variants with insertions or deletions in the reverse transcriptase (RT): multicenter study of patients treated with RT inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 1836-1842.
- Matamoros, T., Deval, J., Guerreiro, C., Mulard, L., Canard, B. y Menéndez-Arias, L. (2005) Suppression of multidrug-resistant HIV-1 reverse transcriptase primer unblocking activity by  $\alpha$ -phosphate-modified thymidine analogues. *J Mol Biol*, **349**, 451-463.
- Matamoros, T., Nevot, M., Martínez, M. A. y Menéndez-Arias, L. (2009) Thymidine analogue resistance suppression by V75I of HIV-1 reverse transcriptase: effects of substituting valine 75 on stavudine excision and discrimination. *J Biol Chem*, **284**, 32792-32802.
- Matamoros, T., Kim, B. y Menéndez-Arias, L. (2008) Mechanistic insights into the role of Val75 of HIV-1 reverse transcriptase in misinsertion and mispair extension fidelity of DNA synthesis. *J Mol Biol*, **375**, 1234-1248.
- Mathiesen, S., Roge, B. T., Weis, N., Lundgren, J. D., Obel, N. y Gerstoft, J. (2004) Foscarnet used in salvage therapy of HIV-1 patients harbouring multiple nucleotide excision mutations. *AIDS*, **18**, 1076-1078.
- McMahon, M. A., Siliciano, J. D., Lai, J., Liu, J. O., Stivers, J. T., Siliciano, R. F. y Kohli, R. M. (2008) The antiherpetic drug acyclovir inhibits HIV replication and selects the V75I reverse transcriptase multidrug resistance mutation. *J Biol Chem*, **283**, 31289-31293.
- Mellors, J. W., Bazmi, H. Z., Schinazi, R. F., Roy, B. M., Hsiou, Y., Arnold, E., Weir, J. y Mayers, D. L. (1995) Novel mutations in reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 reduce susceptibility to foscarnet in laboratory and clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **39**, 1087-1092.
- Menéndez-Arias, L. (2002a) Molecular basis of fidelity of DNA synthesis and nucleotide specificity of retroviral reverse transcriptases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **71**, 91-147.
- Menéndez-Arias, L. (2002b) Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends Pharmacol Sci*, **23**, 381-388.

Menéndez-Arias, L. (2008) Mechanisms of resistance to nucleoside analogue inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Virus Res*, **134**, 124-146.

Menéndez-Arias, L. (2010) Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: an update. *Antiviral Res*, **85**, 210-231.

Menéndez-Arias, L., Abrahá, A., Quiñones-Mateu, M. E., Mas, A., Camarasa, M. J. y Arts, E. J. (2001) Functional characterization of chimeric reverse transcriptases with polypeptide subunits of highly divergent HIV-1 group M and O strains. *J Biol Chem*, **276**, 27470-27479.

Menéndez-Arias, L., Martínez, M. A., Quiñones-Mateu, M. E. y Martínez-Picado, J. (2003) Fitness variations and their impact on the evolution of antiretroviral drug resistance. *Curr Drug Targets Infect Disord*, **3**, 355-371.

Menéndez-Arias, L., Matamoros, T. y Cases-González, C. E. (2006) Insertions and deletions in HIV-1 reverse transcriptase: consequences for drug resistance and viral fitness. *Curr Pharm Des*, **12**, 1811-1825.

Merta, A., Votruba, I., Jindrich, J., Holy, A., Cihlar, T., Rosenberg, I., Otmar, M. y Herve, T. Y. (1992) Phosphorylation of 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine and 9-(S)-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)adenine by AMP(dAMP) kinase from L1210 cells. *Biochem Pharmacol*, **44**, 2067-2077.

Meyer, P. R., Lennerstrand, J., Matsuura, S. E., Larder, B. A. y Scott, W. A. (2003a) Effects of dipeptide insertions between codons 69 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase on primer unblocking, deoxynucleoside triphosphate inhibition, and DNA chain elongation. *J Virol*, **77**, 3871-3877.

Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Mian, A. M., So, A. G. y Scott, W. A. (1999) A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell*, **4**, 35-43.

Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Schinazi, R. F., So, A. G. y Scott, W. A. (2000) Differential removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA chains by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in the presence of physiological concentrations of 2'-deoxynucleoside triphosphates. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 3465-3472.

Meyer, P. R., Matsuura, S. E., So, A. G. y Scott, W. A. (1998) Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13471-13476.

Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Tolun, A. A., Pfeifer, I., So, A. G., Mellors, J. W. y Scott, W. A. (2002) Effects of specific zidovudine resistance mutations and substrate structure on nucleotide-dependent primer unblocking by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 1540-1545.

Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Zonarich, D., Chopra, R. R., Pendarvis, E., Bazmi, H. Z., Mellors, J. W. y Scott, W. A. (2003b) Relationship between 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance and primer unblocking activity in foscarnet-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol*, **77**, 6127-6137.

Meyer, P. R., Rutvisuttinunt, W., Matsuura, S. E., So, A. G. y Scott, W. A. (2007) Stable complexes formed by HIV-1 reverse transcriptase at distinct positions on the primer-template controlled by binding deoxynucleoside triphosphates or foscarnet. *J Mol Biol*, **369**, 41-54.

Meyer, P. R., Smith, A. J., Matsuura, S. E. y Scott, W. A. (2004) Effects of primer-template sequence on ATP-dependent removal of chain-terminating nucleotide analogues by HIV-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem*, **279**, 45389-45398.

Miller, M. D., Margot, N., Lu, B., Zhong, L., Chen, S. S., Cheng, A. y Wulfsohn, M. (2004) Genotypic and phenotypic predictors of the magnitude of response to tenofovir disoproxil fumarate treatment in antiretroviral-experienced patients. *J Infect Dis*, **189**, 837-846.

Miranda, L. R., Götte, M., Liang, F. y Kuritzkes, D. R. (2005) The L74V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase counteracts enhanced excision of zidovudine monophosphate associated with thymidine analog resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 2648-2656.

Mulky, A., Sarafianos, S. G., Jia, Y., Arnold, E. y Kappes, J. C. (2005) Identification of amino acid residues in the human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase tryptophan-repeat motif that are required for subunit interaction using infectious virions. *J Mol Biol*, **349**, 673-684.

Naeger, L. K., Margot, N. A. y Miller, M. D. (2001) Increased drug susceptibility of HIV-1 reverse transcriptase mutants containing M184V and zidovudine-associated mutations: analysis of enzyme processivity, chain-terminator removal and viral replication. *Antivir Ther*, **6**, 115-126.

Naeger, L. K., Margot, N. A. y Miller, M. D. (2002) ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 2179-2184.

Nie, Z., Bergeron, D., Subbramanian, R. A., Yao, X. J., Checroune, F., Rougeau, N. y Cohen, E. A. (1998) The putative  $\alpha$  helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *J Virol*, **72**, 4104-4115.

Nikolenko, G. N., Delviks-Frankenberry, K. A., Palmer, S., Maldarelli, F., Fivash, M. J., Jr., Coffin, J. M. y Pathak, V. K. (2007) Mutations in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase increase 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 317-322.

Nikolenko, G. N., Delviks-Frankenberry, K. A. y Pathak, V. K. (2010) A novel molecular mechanism of dual resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Virol*, **84**, 5238-5249.

Nikolenko, G. N., Palmer, S., Maldarelli, F., Mellors, J. W., Coffin, J. M. y Pathak, V. K. (2005) Mechanism for nucleoside analog-mediated abrogation of HIV-1 replication: balance between RNase H activity and nucleotide excision. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 2093-2098.

Nolan, D. y Mallal, S. (2004) Complications associated with NRTI therapy: update on clinical features and possible pathogenic mechanisms. *Antivir Ther*, **9**, 849-863.



- Olivares, I., Mulky, A., Boross, P. I., Tözsér, J., Kappes, J. C., López-Galíndez, C. y Menéndez-Arias, L. (2007) HIV-1 protease dimer interface mutations that compensate for viral reverse transcriptase instability in infectious virions. *J Mol Biol*, **372**, 369-381.
- Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J. y Holmberg, S. D. (1998) Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*, **338**, 853-860.
- Pandey, P. K., Kaushik, N., Talele, T. T., Yadav, P. N. y Pandey, V. N. (2001) The  $\beta$ 7- $\beta$ 8 loop of the p51 subunit in the heterodimeric (p66/p51) human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase is essential for the catalytic function of the p66 subunit. *Biochemistry*, **40**, 9505-9512.
- Pandey, R. C., Datta, D., Mukerjee, R., Srinivasan, A., Mahalingam, S. y Sawaya, B. E. (2009) HIV-1 Vpr: a closer look at the multifunctional protein from the structural perspective. *Curr HIV Res*, **7**, 114-128.
- Paolucci, S., Baldanti, F., Maga, G., Cancio, R., Zazzi, M., Zavattoni, M., Chiesa, A., Spadari, S. y Gerna, G. (2004) Gln145Met/Leu changes in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer resistance to nucleoside and nonnucleoside analogs and impair virus replication. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 4611-4617.
- Parikh, U. M., Bacheler, L., Koontz, D. y Mellors, J. W. (2006) The K65R mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase exhibits bidirectional phenotypic antagonism with thymidine analog mutations. *J Virol*, **80**, 4971-4977.
- Patnaik, A., Chau, V. y Wills, J. W. (2000) Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13069-13074.
- Pelemans, H., Esnouf, R., De Clercq, E. y Balzarini, J. (2000) Mutational analysis of trp-229 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) identifies this amino acid residue as a prime target for the rational design of new non-nucleoside RT inhibitors. *Mol Pharmacol*, **57**, 954-960.
- Pellegrin, I., Izopet, J., Reynes, J., Denayrolles, M., Montes, B., Pellegrin, J. L., Massip, P., Puel, J., Fleury, H. y Segondy, M. (1999) Emergence of zidovudine and multidrug-resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naïve patients receiving stavudine plus didanosine combination therapy. STADI Group. *AIDS*, **13**, 1705-1709.
- Petropoulos, C. J., Parkin, N. T., Limoli, K. L., Lie, Y. S., Wrin, T., Huang, W., Tian, H., Smith, D., Winslow, G. A., Capon, D. J. y Whitcomb, J. M. (2000) A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 920-928.
- Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E. y Gallo, R. C. (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, **224**, 497-500.
- Prabakaran, P., Dimitrov, A. S., Fouts, T. R. y Dimitrov, D. S. (2007) Structure and function of the HIV envelope glycoprotein as entry mediator, vaccine immunogen, and target for inhibitors. *Adv Pharmacol*, **55**, 33-97.

- Puertas, M. C., Kistic, M., Cozzi-Lepri, A., Bannister, W., Bellido, R., Pou, C., Clotet, B., Paredes, R., Lundgren, J., Menéndez-Arias, L., Martínez-Picado, J. y Grupo EuroSIDA (2010) The amino acid substitution A376S in the HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain confers low-level phenotypic resistance to nevirapine. *Antiviral Therapy*, **15** A84.
- Ray, A. S. (2005) Intracellular interactions between nucleos(t)ide inhibitors of HIV reverse transcriptase. *AIDS Rev*, **7**, 113-125.
- Ray, A. S., Basavapathruni, A. y Anderson, K. S. (2002a) Mechanistic studies to understand the progressive development of resistance in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase to abacavir. *J Biol Chem*, **277**, 40479-40490.
- Ray, A. S., Murakami, E., Basavapathruni, A., Vaccaro, J. A., Ulrich, D., Chu, C. K., Schinazi, R. F. y Anderson, K. S. (2003) Probing the molecular mechanisms of AZT drug resistance mediated by HIV-1 reverse transcriptase using a transient kinetic analysis. *Biochemistry*, **42**, 8831-8841.
- Ray, A. S., Murakami, E., Peterson, C. N., Shi, J., Schinazi, R. F. y Anderson, K. S. (2002b) Interactions of enantiomers of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-fluorocytidine with wild type and M184V mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Antiviral Res*, **56**, 189-205.
- Ren, J., Chamberlain, P. P., Stamp, A., Short, S. A., Weaver, K. L., Romines, K. R., Hazen, R., Freeman, A., Ferris, R. G., Andrews, C. W., Boone, L., Chan, J. H. y Stammers, D. K. (2008) Structural basis for the improved drug resistance profile of new generation benzophenone non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *J Med Chem*, **51**, 5000-5008.
- Ren, J., Diprose, J., Warren, J., Esnouf, R. M., Bird, L. E., Ikemizu, S., Slater, M., Milton, J., Balzarini, J., Stuart, D. I. y Stammers, D. K. (2000a) Phenylethylthiazolylthiourea (PETT) non-nucleoside inhibitors of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases. Structural and biochemical analyses. *J Biol Chem*, **275**, 5633-5639.
- Ren, J., Esnouf, R., Garman, E., Somers, D., Ross, C., Kirby, I., Keeling, J., Darby, G., Jones, Y., Stuart, D. y Stammers, D. (1995a) High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nat Struct Biol*, **2**, 293-302.
- Ren, J., Esnouf, R., Hopkins, A., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D. y Stuart, D. (1995b) The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with 9-chloro-TIBO: lessons for inhibitor design. *Structure*, **3**, 915-926.
- Ren, J., Esnouf, R. M., Hopkins, A. L., Jones, E. Y., Kirby, I., Keeling, J., Ross, C. K., Larder, B. A., Stuart, D. I. y Stammers, D. K. (1998a) 3'-Azido-3'-deoxythymidine drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase can induce long range conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9518-9523.
- Ren, J., Esnouf, R. M., Hopkins, A. L., Warren, J., Balzarini, J., Stuart, D. I. y Stammers, D. K. (1998b) Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase in complex with carboxanilide derivatives. *Biochemistry*, **37**, 14394-14403.
- Ren, J., Milton, J., Weaver, K. L., Short, S. A., Stuart, D. I. y Stammers, D. K. (2000b) Structural basis for the resilience of efavirenz (DMP-266) to drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *Structure*, **8**, 1089-1094.

- Ren, J., Nichols, C., Bird, L. E., Fujiwara, T., Sugimoto, H., Stuart, D. I. y Stammers, D. K. (2000c) Binding of the second generation non-nucleoside inhibitor S-1153 to HIV-1 reverse transcriptase involves extensive main chain hydrogen bonding. *J Biol Chem*, **275**, 14316-14320.
- Ren, J., Nichols, C., Bird, L., Chamberlain, P., Weaver, K., Short, S., Stuart, D. I. y Stammers, D. K. (2001) Structural mechanisms of drug resistance for mutations at codons 181 and 188 in HIV-1 reverse transcriptase and the improved resilience of second generation non-nucleoside inhibitors. *J Mol Biol*, **312**, 795-805.
- Ren, J., Nichols, C. E., Chamberlain, P. P., Weaver, K. L., Short, S. A. y Stammers, D. K. (2004) Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptases mutated at codons 100, 106 and 108 and mechanisms of resistance to non-nucleoside inhibitors. *J Mol Biol*, **336**, 569-578.
- Ren, J. y Stammers, D. K. (2008) Structural basis for drug resistance mechanisms for non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Virus Res*, **134**, 157-170.
- Reuman, E. C., Rhee, S. Y., Holmes, S. P. y Shafer, R. W. (2010) Constrained patterns of covariation and clustering of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations. *J Antimicrob Chemother*, **65**, 1477-1485.
- Rhee, S. Y., Liu, T., Ravela, J., Gonzales, M. J. y Shafer, R. W. (2004) Distribution of human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase mutation patterns in 4,183 persons undergoing genotypic resistance testing. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 3122-3126.
- Rigourd, M., Ehresmann, C., Parniak, M. A., Ehresmann, B. y Marquet, R. (2002) Primer unblocking and rescue of DNA synthesis by azidothymidine (AZT)-resistant HIV-1 reverse transcriptase: comparison between initiation and elongation of reverse transcription and between (-) and (+) strand DNA synthesis. *J Biol Chem*, **277**, 18611-18618.
- Rodgers, D. W., Gamblin, S. J., Harris, B. A., Ray, S., Culp, J. S., Hellmig, B., Woolf, D. J., Debouck, C. y Harrison, S. C. (1995) The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1222-1226.
- Ross, L., Johnson, M., Ferris, R. G., Short, S. A., Boone, L. R., Melby, T. E., Lanier, R., Shaefer, M. y St Clair, M. (2000) Deletions in the  $\beta 3$ - $\beta 4$  hairpin loop of HIV-1 reverse transcriptase are observed in HIV-1 isolated from subjects during long-term antiretroviral therapy. *J Hum Virol*, **3**, 144-149.
- Rücker, E., Grivel, J. C., Münch, J., Kirchhoff, F. y Margolis, L. (2004) Vpr and Vpu are important for efficient human immunodeficiency virus type 1 replication and CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo. *J Virol*, **78**, 12689-12693.
- Sandstrom, E. G., Kaplan, J. C., Byington, R. E. y Hirsch, M. S. (1985) Inhibition of human T-cell lymphotropic virus type III in vitro by phosphonoformate. *Lancet*, **1**, 1480-1482.
- Santos, A. F., Lengruber, R. B., Soares, E. A., Jere, A., Sprinz, E., Martínez, A. M., Silveira, J., Sion, F. S., Pathak, V. K. y Soares, M. A. (2008) Conservation patterns of HIV-1 RT connection and RNase H domains: identification of new mutations in NRTI-treated patients. *PLoS One*, **3**, e1781.

Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Das, K., Tuske, S., Birktoft, J. J., Ilankumaran, P., Ramesha, A. R., Sayer, J. M., Jerina, D. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2002) Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA. *EMBO J*, **21**, 6614-6624.

Sarafianos, S. G., Das, K., Clark, A. D., Jr., Ding, J., Boyer, P. L., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1999a) Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with  $\beta$ -branched amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10027-10032.

Sarafianos, S. G., Das, K., Ding, J., Boyer, P. L., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1999b) Touching the heart of HIV-1 drug resistance: the fingers close down on the dNTP at the polymerase active site. *Chem Biol*, **6**, R137-R146.

Sarafianos, S. G., Das, K., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2004) Taking aim at a moving target: designing drugs to inhibit drug-resistant HIV-1 reverse transcriptases. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 716-730.

Sarafianos, S. G., Das, K., Tantillo, C., Clark, A. D., Jr., Ding, J., Whitcomb, J. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2001) Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO J*, **20**, 1449-1461.

Sarafianos, S. G., Marchand, B., Das, K., Himmel, D. M., Parniak, M. A., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2009) Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J Mol Biol*, **385**, 693-713.

Sarin, P. S., Taguchi, Y., Sun, D., Thornton, A., Gallo, R. C. y Oberg, B. (1985) Inhibition of HTLV-III/LAV replication by foscarnet. *Biochem Pharmacol*, **34**, 4075-4079.

Schinazi, R. F., Hernandez-Santiago, B. I. y Hurwitz, S. J. (2006) Pharmacology of current and promising nucleosides for the treatment of human immunodeficiency viruses. *Antiviral Res*, **71**, 322-334.

Schuckmann, M. M., Marchand, B., Hachiya, A., Kodama, E. N., Kirby, K. A., Singh, K. y Sarafianos, S. G. (2010) The N348I mutation at the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase decreases binding to nevirapine. *J Biol Chem*, DOI 10.1074/jbc.M110.153783.

Selmi, B., Boretto, J., Sarfati, S. R., Guerreiro, C. y Canard, B. (2001) Mechanism-based suppression of dideoxynucleotide resistance by K65R human immunodeficiency virus reverse transcriptase using an  $\alpha$ -boranophosphate nucleoside analogue. *J Biol Chem*, **276**, 48466-48472.

Selmi, B., Deval, J., Alvarez, K., Boretto, J., Sarfati, S., Guerreiro, C. y Canard, B. (2003) The Y181C substitution in 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistant human immunodeficiency virus, type 1, reverse transcriptase suppresses the ATP-mediated repair of the 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-monophosphate-terminated primer. *J Biol Chem*, **278**, 40464-40472.

Shah, F. S., Curr, K. A., Hamburgh, M. E., Parniak, M., Mitsuya, H., Arnez, J. G. y Prasad, V. R. (2000) Differential influence of nucleoside analog-resistance mutations K65R and L74V on the overall mutation rate and error specificity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Biol Chem*, **275**, 27037-27044.

Sharma, P. L. y Crumpacker, C.S. (1997) Attenuated replication of human immunodeficiency virus type 1 with a didanosine-selected reverse transcriptase mutation. *J Virol*, **71**, 8846-8851.

- Sharma, P. L. y Crumpacker, C. S. (1999) Decreased processivity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) containing didanosine-selected mutation Leu74Val: a comparative analysis of RT variants Leu74Val and lamivudine-selected Met184Val. *J Virol*, **73**, 8448-8456.
- Shaw, J. P., Utz, P. J., Durand, D. B., Toole, J. J., Emmel, E. A. y Crabtree, G. R. (1988) Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, **241**, 202-205.
- Shirasaka, T., Kavlick, M. F., Ueno, T., Gao, W. Y., Kojima, E., Alcaide, M. L., Chokekijchai, S., Roy, B. M., Arnold, E., Yarchoan, R. y Mitsuya, H. (1995) Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2398-2402.
- Sluis-Cremer, N., Arion, D., Kaushik, N., Lim, H. y Parniak, M. A. (2000) Mutational analysis of Lys65 of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem J*, **348 Pt 1**, 77-82.
- Sluis-Cremer, N., Sheen, C. W., Zelina, S., Torres, P. S., Parikh, U. M. y Mellors, J. W. (2007) Molecular mechanism by which the K70E mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**, 48-53.
- Sluis-Cremer, N. y Tachedjian, G. (2008) Mechanisms of inhibition of HIV replication by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Virus Res*, **134**, 147-156.
- Sluis-Cremer, N., Temiz, N. A. y Bahar, I. (2004) Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding. *Curr HIV Res*, **2**, 323-332.
- Smerdon, S. J., Jager, J., Wang, J., Kohlstaedt, L. A., Chirino, A. J., Friedman, J. M., Rice, P. A. y Steitz, T. A. (1994) Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3911-3915.
- Smith, A. J., Meyer, P. R., Asthana, D., Ashman, M. R. y Scott, W. A. (2005) Intracellular substrates for the primer-unblocking reaction by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: detection and quantitation in extracts from quiescent- and activated-lymphocyte subpopulations. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 1761-1769.
- Smith, A. J. y Scott, W. A. (2006) The influence of natural substrates and inhibitors on the nucleotide-dependent excision activity of HIV-1 reverse transcriptase in the infected cell. *Curr Pharm Des*, **12**, 1827-1841.
- Sonntag, K. C. y Darai, G. (1995) Evolution of viral DNA-dependent RNA polymerases. *Virus Genes*, **11**, 271-284.
- Sousa, R. (1996) Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases. *Trends Biochem Sci*, **21**, 186-190.
- Spence, R. A., Anderson, K. S. y Johnson, K. A. (1996) HIV-1 reverse transcriptase resistance to nonnucleoside inhibitors. *Biochemistry*, **35**, 1054-1063.

Spence, R. A., Kati, W. M., Anderson, K. S. y Johnson, K. A. (1995) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science*, **267**, 988-993.

St Clair, M. H., Martin, J. L., Tudor-Williams, G., Bach, M. C., Vavro, C. L., King, D. M., Kellam, P., Kemp, S. D. y Larder, B. A. (1991) Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, **253**, 1557-1559.

Sugiura, W., Matsuda, M., Matsuda, Z., Abumi, H., Okano, A., Oishi, T., Moriya, K., Yamamoto, Y., Fukutake, K., Mimaya, J., Ajisawa, A., Taki, M., Yamada, K. y Nagai, Y. (1999) Identification of insertion mutations in HIV-1 reverse transcriptase causing multiple drug resistance to nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *J Hum Virol*, **2**, 146-153.

Suzuki, K., Kaufmann, G. R., Mukaide, M., Cunningham, P., Harris, C., Leas, L., Kondo, M., Imai, M., Pett, S. L., Finlayson, R., Zaunders, J., Kelleher, A. y Cooper, D. A. (2001) Novel deletion of HIV type 1 reverse transcriptase residue 69 conferring selective high-level resistance to nevirapine. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **17**, 1293-1296.

Svicher, V., Sing, T., Santoro, M. M., Forbici, F., Rodríguez-Barrios, F., Bertoli, A., Beerenwinkel, N., Bellocchi, M. C., Gago, F., d'Arminio Monforte, A., Antinori, A., Lengauer, T., Ceccherini-Silberstein, F. y Perno, C. F. (2006) Involvement of novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutations in the regulation of resistance to nucleoside inhibitors. *J Virol*, **80**, 7186-7198.

Sylla, M., Chamberland, A., Boileau, C., Traore, H. A., Ag-Aboubacrine, S., Cisse, M., Koala, S., Drabo, J., Diallo, I., Niamba, P., Tremblay-Sher, D., Machouf, N., Rashed, S., Nickle, D. C., Nguyen, V. K. y Tremblay, C. L. (2008) Characterization of drug resistance in antiretroviral-treated patients infected with HIV-1 CRF02\_AG and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso. *Antivir Ther*, **13**, 141-148.

Tachedjian, G. y Goff, S. P. (2003) The effect of NNRTIs on HIV reverse transcriptase dimerization. *Curr Opin Investig Drugs*, **4**, 966-973.

Tachedjian, G., Hooker, D. J., Gurusinghe, A. D., Bazmi, H., Deacon, N. J., Mellors, J., Birch, C. y Mills, J. (1995) Characterisation of foscarnet-resistant strains of human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, **212**, 58-68.

Tachedjian, G., Mellors, J., Bazmi, H., Birch, C. y Mills, J. (1996) Zidovudine resistance is suppressed by mutations conferring resistance of human immunodeficiency virus type 1 to foscarnet. *J Virol*, **70**, 7171-7181.

Tachedjian, G., Mellors, J. W., Bazmi, H. y Mills, J. (1998) Impaired fitness of foscarnet-resistant strains of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **14**, 1059-1064.

Tachedjian, G., Moore, K. L., Goff, S. P. y Sluis-Cremer, N. (2005) Efavirenz enhances the proteolytic processing of an HIV-1 pol polyprotein precursor and reverse transcriptase homodimer formation. *FEBS Lett*, **579**, 379-384.

Tachedjian, G., Orlova, M., Sarafianos, S. G., Arnold, E. y Goff, S. P. (2001) Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors are chemical enhancers of dimerization of the HIV type 1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7188-7193.

- Tamalet, C., Yahi, N., Tourrès, C., Colson, P., Quinson, A. M., Poizot-Martin, I., Dhiver, C. y Fantini, J. (2000) Multidrug resistance genotypes (insertions in the  $\beta 3$ - $\beta 4$  finger subdomain and MDR mutations) of HIV-1 reverse transcriptase from extensively treated patients: incidence and association with other resistance mutations. *Virology*, **270**, 310-316.
- Tambuyzer, L., Azijn, H., Rimsky, L. T., Vingerhoets, J., Lecocq, P., Kraus, G., Picchio, G. y de Béthune, M. P. (2009) Compilation and prevalence of mutations associated with resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antivir Ther*, **14**, 103-109.
- Tantillo, C., Ding, J., Jacobo-Molina, A., Nanni, R. G., Boyer, P. L., Hughes, S. H., Pauwels, R., Andries, K., Janssen, P. A. y Arnold, E. (1994) Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J Mol Biol*, **243**, 369-387.
- Tchesnokov, E. P., Obikhod, A., Massud, I., Lisco, A., Vanpouille, C., Brichacek, B., Balzarini, J., McGuigan, C., Derudas, M., Margolis, L., Schinazi, R. F. y Götte, M. (2009) Mechanisms associated with HIV-1 resistance to acyclovir by the V75I mutation in reverse transcriptase. *J Biol Chem*, **284**, 21496-21504.
- Temin, H. M. y Mizutani, S. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, **226**, 1211-1213.
- Tong, W., Lu, C. D., Sharma, S. K., Matsuura, S., So, A. G. y Scott, W. A. (1997) Nucleotide-induced stable complex formation by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, **36**, 5749-5757.
- Traut, T. W. (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem*, **140**, 1-22.
- Tu, X., Das, K., Han, Q., Bauman, J. D., Clark, A. D., Jr., Hou, X., Frenkel, Y. V., Gaffney, B. L., Jones, R. A., Boyer, P. L., Hughes, S. H., Sarafianos, S. G. y Arnold, E. (2010) Structural basis of HIV-1 resistance to AZT by excision. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 1202-1209.
- Turner, B. G. y Summers, M. F. (1999) Structural biology of HIV. *J Mol Biol*, **285**, 1-32.
- Tuske, S., Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr., Ding, J., Naeger, L. K., White, K. L., Miller, M. D., Gibbs, C. S., Boyer, P. L., Clark, P., Wang, G., Gaffney, B. L., Jones, R. A., Jerina, D. M., Hughes, S. H. y Arnold, E. (2004) Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 469-474.
- Ueno, T. y Mitsuya, H. (1997) Comparative enzymatic study of HIV-1 reverse transcriptase resistant to 2',3'-dideoxynucleotide analogs using the single-nucleotide incorporation assay. *Biochemistry*, **36**, 1092-1099.
- Ueno, T., Shirasaka, T. y Mitsuya, H. (1995) Enzymatic characterization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase resistant to multiple 2',3'-dideoxynucleoside 5'-triphosphates. *J Biol Chem*, **270**, 23605-23611.
- Upadhyay, A., Pandey, N., Mishra, C. A., Talele, T. T. y Pandey, V. N. (2010) A single deletion at position 134, 135, or 136 in the  $\beta 7$ - $\beta 8$  loop of the p51 subunit of HIV-1 RT disrupts the formation of heterodimeric enzyme. *J Cell Biochem*, **109**, 598-605.

- Van Vaerenbergh, K., Van Laethem, K., Albert, J., Boucher, C. A., Clotet, B., Florida, M., Gerstoft, J., Hejdeman, B., Nielsen, C., Pannecouque, C., Perrin, L., Pirillo, M. F., Ruiz, L., Schmit, J. C., Schneider, F., Schoolmeester, A., Schuurman, R., Stellbrink, H. J., Stuyver, L., Van Lunzen, J., Van Remoortel, B., Van Wijngaerden, E., Vella, S., Witvrouw, M., Yerly, S., De Clercq, E., Destmyer, J. y Vandamme, A. M. (2000) Prevalence and characteristics of multinucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 among European patients receiving combinations of nucleoside analogues. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 2109-2117.
- Villena, C., Prado, J. G., Puertas, M. C., Martínez, M. A., Clotet, B., Ruiz, L., Parkin, N. T., Menéndez-Arias, L. y Martínez-Picado, J. (2007) Relative fitness and replication capacity of a multinucleoside analogue-resistant clinical human immunodeficiency virus type 1 isolate with a deletion of codon 69 in the reverse transcriptase coding region. *J Virol*, **81**, 4713-4721.
- Vivet-Boudou, V., Didierjean, J., Isel, C. y Marquet, R. (2006) Nucleoside and nucleotide inhibitors of HIV-1 replication. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 163-186.
- Wallis, C. L., Venter, W. D., Stevens, W. S. y Papathanasopoulos, M. A. (2010) Case report of the rare deletion at codon 69 of reverse transcriptase in a South African HIV-1 subtype C infected patient. *Virus Genes*, **41**, 358-360.
- Wang, J., Jin, Y., Rapp, K. L., Schinazi, R. F. y Chu, C. K. (2007) D- and L-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-3'-fluoro-carbocyclic nucleosides: synthesis, anti-HIV activity and mechanism of resistance. *J Med Chem*, **50**, 1828-1839.
- Wang, J., Smerdon, S. J., Jager, J., Kohlstaedt, L. A., Rice, P. A., Friedman, J. M. y Steitz, T. A. (1994) Structural basis of asymmetry in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7242-7246.
- Waters, J. M., O'Neal, W., White, K. L., Wakeford, C., Lansdon, E. B., Harris, J., Svarovskaia, E. S., Miller, M. D. y Borroto-Esoda, K. (2009) Mutations in the thumb-connection and RNase H domain of HIV type-1 reverse transcriptase of antiretroviral treatment-experienced patients. *Antivir Ther*, **14**, 231-239.
- Weber, J., Chakraborty, B., Weberova, J., Miller, M. D. y Quiñones-Mateu, M. E. (2005) Diminished replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates harboring the K65R mutation. *J Clin Microbiol*, **43**, 1395-1400.
- White, K. L., Chen, J. M., Feng, J. Y., Margot, N. A., Ly, J. K., Ray, A. S., Macarthur, H. L., McDermott, M. J., Swaminathan, S. y Miller, M. D. (2006) The K65R reverse transcriptase mutation in HIV-1 reverses the excision phenotype of zidovudine resistance mutations. *Antivir Ther*, **11**, 155-163.
- White, K. L., Chen, J. M., Margot, N. A., Wrin, T., Petropoulos, C. J., Naeger, L. K., Swaminathan, S. y Miller, M. D. (2004) Molecular mechanisms of tenofovir resistance conferred by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase containing a diserine insertion after residue 69 and multiple thymidine analog-associated mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 992-1003.
- Willis, S. H., Kazmierczak, K. M., Carter, R. H. y Rothman-Denes, L. B. (2002) N4 RNA polymerase II, a heterodimeric RNA polymerase with homology to the single-subunit family of RNA polymerases. *J Bacteriol*, **184**, 4952-4961.



- Wilson, J. E., Aulabaugh, A., Caligan, B., McPherson, S., Wakefield, J. K., Jablonski, S., Morrow, C. D., Reardon, J. E. y Furman, P. A. (1996) Human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase. Contribution of Met-184 to binding of nucleoside 5'-triphosphate. *J Biol Chem*, **271**, 13656-13662.
- Wilson, W., Braddock, M., Adams, S. E., Rathjen, P. D., Kingsman, S. M. y Kingsman, A. J. (1988) HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell*, **55**, 1159-1169.
- Winters, M. A., Coolley, K. L., Cheng, P., Girard, Y. A., Hamdan, H., Kovari, L. C. y Merigan, T. C. (2000) Genotypic, phenotypic, and modeling studies of a deletion in the  $\beta$ 3- $\beta$ 4 region of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene that is associated with resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Virol*, **74**, 10707-10713.
- Winters, M. A., Coolley, K. L., Girard, Y. A., Levee, D. J., Hamdan, H., Shafer, R. W., Katzenstein, D. A. y Merigan, T. C. (1998) A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors. *J Clin Invest*, **102**, 1769-1775.
- Winters, M. A. y Merigan, T. C. (2001) Variants other than aspartic acid at codon 69 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene affect susceptibility to nucleoside analogs. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 2276-2279.
- Winters, M. A. y Merigan, T. C. (2005) Insertions in the human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase genes: clinical impact and molecular mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 2575-2582.
- Winters, M. A., Shafer, R. W., Jellinger, R. A., Mamtora, G., Gingeras, T. y Merigan, T. C. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase genotype and drug susceptibility changes in infected individuals receiving dideoxyinosine monotherapy for 1 to 2 years. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 757-762.
- Xia, Q., Radzio, J., Anderson, K. S. y Sluis-Cremer, N. (2007) Probing nonnucleoside inhibitor-induced active-site distortion in HIV-1 reverse transcriptase by transient kinetic analyses. *Protein Sci*, **16**, 1728-1737.
- Yahi, N., Tamalet, C., Tourrès, C., Tivoli, N., Ariasi, F., Volot, F., Gastaut, J. A., Gallais, H., Moreau, J. y Fantini, J. (1999) Mutation patterns of the reverse transcriptase and protease genes in human immunodeficiency virus type 1-infected patients undergoing combination therapy: survey of 787 sequences. *J Clin Microbiol*, **37**, 4099-4106.
- Yahi, N., Tamalet, C., Tourrès, C., Tivoli, N. y Fantini, J. (2000) Mutation L210W of HIV-1 reverse transcriptase in patients receiving combination therapy. Incidence, association with other mutations, and effects on the structure of mutated reverse transcriptase. *J Biomed Sci*, **7**, 507-513.
- Yap, S. H., Sheen, C. W., Fahey, J., Zanin, M., Tyssen, D., Lima, V. D., Wynhoven, B., Kuiper, M., Sluis-Cremer, N., Harrigan, P. R. y Tachedjian, G. (2007) N348I in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase confers zidovudine and nevirapine resistance. *PLoS Med*, **4**, e335.
- Yin, P. D., Das, D. y Mitsuya, H. (2006) Overcoming HIV drug resistance through rational drug design based on molecular, biochemical, and structural profiles of HIV resistance. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 1706-1724.

Yoon, V., Fridkis-Hareli, M., Munisamy, S., Lee, J., Anastasiades, D. y Stevceva, L. (2010) The GP120 molecule of HIV-1 and its interaction with T cells. *Curr Med Chem*, **17**, 741-749.

Zhan, P., Liu, X., Fang, Z., Li, Z., Pannecouque, C. y De Clercq, E. (2009a) Synthesis and anti-HIV activity evaluation of 2-(4-(naphthalen-2-yl)-1,2,3-thiadiazol-5-ylthio)-N-acetamides as novel non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Eur J Med Chem*, **44**, 4648-4653.

Zhan, P., Liu, X., Zhu, J., Fang, Z., Li, Z., Pannecouque, C. y Clercq, E. D. (2009b) Synthesis and biological evaluation of imidazole thioacetanilides as novel non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, **17**, 5775-5781.